Untersuchungen zur molekularbiologischen Charakterisierung der Nitratassimilation in der Symbiose zwischen dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus* und Tomate

- Expression von Genen des Nitratassimilationssystems
- Abschätzung des pilzlichen rRNA-Anteils in der Symbiose
- Wachstum von *Glomus intraradices* ohne Wirt

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Ulrich Hildebrandt
aus Grevenbroich

Hundt Druck GmbH, Köln
2001

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Bothe

Prof. Dr. Hj.A.W. Schneider-Poetsch

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 07.11. 2000

Abstract

The role of the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus *Glomus intraradices* in assisting its host plant tomato in nitrate assimilation was studied. Parts of the genes coding for putative low- and high-affinity nitrate transporters (NTR), nitrate and nitrite reductases were specifically amplified from tomato root cDNA (or DNA) by PCR, subsequently cloned and sequenced.
Some characteristics of nitrate transporter genes were investigated: The low-affinity nitrate transporter gene *Tomate-lo1* (*LeNRT 1;1)* and the putative high-affinity nitrate transporter genes *Tomate-hi2* (*LeNRT2;2*) and *Tomate-hi3* were expressed in nitrate-grown tomato roots, as demonstrated by Northern-analysis. In addition, the expression of tomato NTR-, nitrate and nitrite reductase genes was influenced by different external N-sources.
Tomate-hi2 and *Tomate-hi3* differ in their transcript levels when glutamine was the sole N-source in the nutrient solution.
In situ-hybridization experiments showed a tissue-specific localization of *Tomate-lo1* and *Tomate-hi3* transcripts in tomato roots. The results of RT-PCR-experiments indicate that the expression of tomato high-affinity nitrate transporter genes is not restricted to roots.
Northern-analyses show that the mRNA level of the putative high-affinity nitrate transporter gene *Tomate-hi3* is significantly increased in mycorrhizal plants, whereas transcript levels of *Tomate-hi2* and *Tomate-lo1* remain more or less unaltered in mycorrhizal plants in comparison to non-colonized controls. The expression of *Tomate-hi3* is expanded into cortical cells of mycorrhizal roots, in contrast to the situation in non-colonized roots, as shown by *in situ*-hybridization experiments. A specific expression in cells containing arbuscules was not observed.
Transcript levels of the tomato nitrate reductase gene were only weakly increased in leaves of mycorrhizal plants, whereas a significant increase in tomato nitrite reductase transcript levels in leaves of mycorrhizal tomato was observed. The specific nitrate reductase activity of mycorrhizal plants was slightly increased in all experiments.
Glomus nitrate reductase mRNA was detected in mycorrhizal tomato roots by Northern-analysis. RT-PCR-experiments and activity measurements indicate that the fungal nitrate reductase is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices.*
The data-set obtained is discussed with respect to the role of AM-fungi in nitrate-assimilation in the arbuscular mycorrhizal symbiosis.

Data on AM-fungal biomass do not necessarily represent the fungal rRNA content in mycorrhizal roots. Therefore RNA-Dot-Blot experiments were performed using the internal transcribed spacer-5.8S ribosomal DNA as a molecular probe to assess the proportion of fungal rRNA in mycorrhizal roots. The obtained data suggest that the AM-fungal rRNA might represent up to 50% of total mycorrhizal root RNA.

Insufficiently surface-disinfected spores of *Glomus intraradices* allowed the isolation of an AM-associated bacterium (*Paenibacillus* sp.). The co-culture of germinating spores of *Glomus intraradices* Sy167 with *Paenibacillus* sp. was monitored. Presence of *Paenibacillus* sp. led to an improved growth of *Glomus*-hyphae and to morphological alterations of the formed mycelium. A more intense branching, the formation of arbuscule-like structures and spores was observed. The morphology of *Glomus intraradices* germinated with *Paenibacillus* sp. differed in comparison to structures observed in an AM-culture system with Ri T-DNA transformed carrot-roots.

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe molekularbiologischer Methoden der Einfluß einer Mykorrhizierung mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* auf die Expression von Genen des Nitratassimilations-Systems der Wirtspflanze *Lycopersicon esculentum* (Tomate) untersucht.
PCR-Experimente führten zur Klonierung von 3´-nicht-translatierten Bereichen je zweier low- und high-affinity Nitrattransportergene (*Tomate-lo1 (=LeNRT1;1)*, *Tomate-lo2(=LeNRT1;2)*, *Tomate-hi2 (=LeNRT2;2)* und *Tomate-hi3*) von Tomate. Wie Sequenzvergleiche und Southern-Hybridisierungen zeigen, handelt es sich bei *Tomate-hi3* um ein bisher unbekanntes zu high-affinity Nitrattransportern homologes Gen aus Tomate. Untersuchungen zur Nitratinduzierbarkeit von *Tomate-lo1*, *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* ergaben, daß alle untersuchten Nitrattransportergene durch exogenes Nitrat induzierbar sind und daher deutlich erhöhte Transkriptmengen nach einer Nitratgabe aufweisen.
Darüber hinaus wird die Expression der untersuchten Tomaten NTR-, Nitrat- und Nitritreduktasegene durch unterschiedliche von außen angebotene Stickstoffquellen beeinflußt. Deutliche Unterschiede bezüglich der Transkriptmengen von *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* treten mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle auf.
Durch RNA *In situ*-Hybridisierungen konnte in Tomatenwurzeln eine gewebsspezifische Transkript-Lokalisierung für *Tomate-lo1* und *Tomate-hi3* gezeigt werden. Die Resultate von RT-PCR-Experimenten deuten allerdings auch auf eine Expression in oberirdischen Pflanzenteilen von Tomate hin.
Durch Northern-Hybridisierungen konnte gezeigt werden, daß die Transkriptmenge von *Tomate-hi3* in mykorrhizierten Tomatenwurzeln, im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Wurzeln, etwa zweifach erhöht ist. Die Expression der beiden weiteren untersuchten Nitrattransportergene *Tomate-lo1* und *Tomate-hi2* wird durch eine Mykorrhizierung unter den gewählten Bedingungen nur in geringem Maße beeinflußt.
In den Wurzeln mykorrhizierter Tomatenpflanzen wird *Tomate-hi3*, im Gegensatz zu nicht-mykorrhizierten Wurzeln, zusätzlich zur Rhizodermis in weiter innen gelegenen Schichten des Rindenparenchyms älterer Wurzelabschnitte exprimiert. Eine verstärkte Expression in Arbuskel-enthaltenden Zellen konnte nicht beobachtet werden.
Im Vergleich zu den Wurzeln der Kontrollpflanzen ist die Expression des Nitritreduktasegens in den mykorrhizierten Wurzeln leicht erhöht, während kein deutlicher Unterschied für das Nitratreduktasegen zu erkennen ist. In den Blättern mykorrhizierter Pflanzen sind für beide Gene leicht erhöhte Transkriptmengen zu beobachten. Die Nitratreduktase-Aktivität mykorrhizierter Tomatenpflanzen ist, im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen, in Wurzeln und Blättern leicht erhöht.
Durch Northern-Hybridisierungen mit einer Sonde für ein Nitratreduktasegen aus *Glomus intraradices* Sy167 konnte gezeigt werden, daß dieses in mykorrhizierten Wurzeln exprimiert wird. Erstmals konnte eine *In vitro*-NR-Aktivität mit Rohextrakten des extraradikalen Myzels von *Glomus intraradices* nachgewiesen werden.
Die Rolle arbuskulärer Mykorrhizapilze bei der Nitratassimilation in der Symbiose wird unter Bezugnahme auf die erhaltenen Ergebnisse diskutiert.
RNA-Dot-Blot Hybridisierungen mit einer ITS-5,8S-rDNA Sonde von *Glomus intraradices* deuten auf einen bis zu 50%igen Anteil pilzlicher rRNA an der Gesamt-RNA mykorrhizierter Wurzeln hin.
Die Co-Kultur des als obligat biotroph geltenden AM-Pilzes *Glomus intraradices* Sy167 mit dem AM-assoziierten Bakterium *Paenibacillus* sp., führt zu deutlich verstärktem Wachstum, morphologischen Veränderungen und zur Ausbildung von Sporen.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1 Einleitung 1

1.1 Mykorrhiza 1

1.2 N-Assimilation 4

1.3 Axenische Kultur von AM-Pilzen 8

2. Material und Methoden 9

2.1. Versuchsobjekte 9

2.1.1 Organismen 9

2.1.2 Oberflächensterilisierung von Saatgut 9

2.1.3 Oberflächensterilisierung von *Glomus*-Sporen 9

2.1.4 Kultur von AM-Pilzen 10
2.1.4.1 Duale monoxenische Kultur von AM-Pilzen mit transformierten Karottenwurzeln 10
2.1.4.2 Wachstum von AM-Pilzen ohne Wirt 10

2.1.5 AM-Pilz-Inokulumproduktion 10

2.1.6 Kulturbedingungen zur Anzucht der Versuchspflanzen 11

2.1.7 Ernte der Versuchspflanzen 14
2.1.7.1 Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades 14
2.1.7.1.1 Färbung der Wurzeln mit Lactophenolblau 14
2.1.7.1.2 Färbung der Wurzeln mit Tinte und Haushaltsessig 15
2.1.7.2 Mikroskopische Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades 15

2.1.8 Isolierung und Reinigung von AM-Sporen und -Hyphen 15
2.1.8.1 Ernte von Pilzmaterial aus den Kompartimentsystemen 16

2.2 Isolierung von Nukleinsäuren 16

2.2.1 Isolierung genomischer DNA mit CTAB nach Doyle und Doyle 16

2.2.2 Isolierung genomischer DNA nach Raeder und Broda 17

2.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial 17

2.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus AM-Hyphen und -Sporen 18

2.2.5 Isolierung von Plasmiden aus transformierten Kulturen von *Escherichia coli* 19

2.2.6	Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren	19
2.3	Amplifizierung von DNA-Segmenten durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.3.1	Oligonukleotidprimer	20
2.3.1.1	Auswahl geeigneter Sequenzbereiche zur Entwicklung von Oligonukleotidprimern	20
2.3.1.2	Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendete Primer	21
2.3.2	PCR-Reaktionsbedingungen	22
2.3.3	Die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	22
2.3.3.1	Erststrangsynthese	23
2.3.3.2	3´-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	24
2.3.4	PCR mit einzelnen *Glomus*-Sporen und anschließende RFLP-Analyse	24
2.3.4.1	Einzelsporen-PCR-Ansätze	24
2.3.4.2	Verdau von Einzelsporen-PCR-Amplifikaten zur Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP´s)	25
2.3.5	Analyse der PCR-Produkte	25
2.3.6	Aufreinigung und Gelelution von PCR-Amplifikaten und DNA-Fragmenten	26
2.4	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Amplifikaten	26
2.4.1	Ansätze zur Ligation von PCR-Amplifikaten in die Klonierungsvektoren pCR™II und pGEM®-T Easy	26
2.4.2	Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli* Zellen	27
2.4.3	Blau-Weiß-Selektion der transformierten Klone	27
2.4.4	Aufbereitung von Plasmid-DNA für die Sequenzierung	29
2.4.5	Sequenzierung der klonierten DNA-Segmente	29
2.5	Herstellung markierter DNA- und RNA-Sonden für Hybridisierungs-Experimente	31
2.5.1	Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin durch PCR	31
2.5.2	Herstellung von RNA-Sonden durch *In vitro*-Transkription	31
2.5.2.1	Linearisierung der als Matrize eingesetzten Plasmide	31
2.5.2.2	Herstellung von mit Digoxigenin markierten RNA-Sonden	32
2.5.2.3	Herstellung radioaktiv markierter RNA-Sonden	32
2.5.2.4	Größenbestimmung und partielle Hydrolyse der Transkripte	33

2.6 Hybridisierung von DNA und RNA mit Dig-markierten Gensonden 33

2.6.1 Verdauung genomischer DNA mit Restriktionsenzymen 33

2.6.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen 34

2.6.3 Auftrennung von RNA auf denaturierenden Agarosegelen 34

2.6.4 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen 34
2.6.4.1 Transfer von DNA auf Nylonmembran (Southern-Transfer) 35
2.6.4.2 Übertragung von RNA auf Nylonmembran (Northern-Transfer) 35
2.6.4.2.1 Vakuum-RNA-Dot-Blotting 35

2.6.5 Hybridisierung der Filter mit Dig-markierten DNA- oder RNA-Sonden 36

2.6.6 Waschen der Filter und Nachweis der mit Digoxigenin markierten Sonden 36

2.6.7 Quantifizierung von Hybridisierungssignalen 37

2.6.8 Entfernen der mit Digoxigenin markierten RNA-Sonden 38

2.7 *In situ*-RNA-Hybridisierungen 38

2.7.1 Fixierung und Einbettung des verwendeten Pflanzen- und Pilzmaterials 38

2.7.2 Fixierung von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln mit Glutaraldehyd 38

2.7.3 Einbettung in Fibrowax 38

2.7.4 Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin 39

2.7.5 Schneiden der eingebetteten Wurzeln 40

2.7.6 *In situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten RNA-Sonden 40
2.7.6.1 Vorbehandlung der Schnitte 40
2.7.6.2 Hybridisierung mit radioaktiv markierten RNA-Sonden 40
2.7.6.3 Waschen der Schnitte 41

2.7.7 Mikroautoradiographie zum Nachweis der Hybridisierungssignale 41
2.7.7.1 Beschichtung der Objektträger mit Fotoemulsion 41
2.7.7.2 Entwicklung der Mikroautoradiogramme 42
2.7.7.3 Herstellung von Dauerpräparaten 42
2.7.7.4 Fotografische Dokumentation der Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierungen und Quantifizierung der Hybridisierungssignale 42

2.8 Bestimmung der Nitratreduktaseaktivität (NRA) von Pflanzen- und Pilzextrakten 42

2.8.1 Herstellung von Proteinrohextrakten aus Pflanzen- und Pilzmaterial 42

2.8.2 Messung der Nitratreduktaseaktivität in Proteinrohextrakten 43

2.9 Computer-Analyse von DNA- und Proteinsequenzen 44

2.9.1 DNA-Sequenzanalyse und Translation von DNA-Sequenzen 44

2.9.2 Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen 44

2.9.3 Primeranalyse 44

2.9.4 Benutzung von Datenbanken 44

3. Ergebnisse 45

3.1 PCR-Amplifizierung von DNA-Segmenten aus Genen, die für Bestandteile des Nitratassimilationssystems höherer Pflanzen kodieren 45

3.1.1 Identifizierung konservierter Sequenzbereiche in Nitrattransportergenen höherer Pflanzen 45

3.1.1.1 Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von low-affinity Nitrattransportern 46

3.1.1.2 Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von high-affinity Nitrattransportern 47

3.1.2 Vergleich von AS-Sequenzen zweier Nitritreduktase-AS-Sequenz-Bereiche 47

3.1.3 Primer für die Amplifizierung eines Segmentes aus dem Nitratreduktasegen von Tomate 48

3.1.4 Resultate der PCR-Experimente 48

3.1.4.1 PCR-Experimente zur Gewinnung von Gensonden für Nitrattransporter höherer Pflanzen 48

3.1.4.2 PCR-Amplifizierung eines Segmentes des Nitratreduktasegens von Tomate 50

3.1.4.3 PCR-Amplifizierung eines Segmentes eines Nitritreduktasegens von Tomate 50

3.1.5 Analyse der PCR-Produkte - Klonierung und Sequenzierung von Teilsegmenten von Nitrattransporter-, Nitratreduktase- und Nitritreduktasegenen 51

3.1.6	Entwicklung von Sonden unter Verwendung des 3´-RACE-Verfahrens zur Analyse der Expression von pflanzlichen Nitrattransportergenen	56
3.1.6.1	Auswahl geeigneter Sequenzbereiche zur Herstellung von genspezifischen Primern für low- und high-affinity Nitrattransportergene zur Durchführung von 3´-RACE-Experimenten	57
3.1.6.2	3´-RACE-Experimente zur Amplifizierung von 3´-nicht-translatierten cDNA-Enden von Nitrattransportergenen von Tomate	57
3.1.6.3	RT-PCR-Nachweis: T1-7 und PNT5.7-1 sind Bestandteile von *Tomate-hi3*	61
3.2	Kreuzhybridisierung zwischen den unterschiedlichen RACE-Produkten	63
3.3	Resultate von Hybridisierungen zwischen PCR-Produkten klonierter high-affinity Nitrattransportergensegmente mit genomischer DNA aus Tomate	64
3.4	Untersuchungen zur Expression von Nitrattransportergenen in Wurzeln und oberirdischen Pflanzenteilen von Tomate	65
3.4.1	Untersuchungen zur Induzierbarkeit von Nitrattransportergenen in Tomate durch Nitrat	66
3.4.2	Expression von low- und high-affinity Nitrattransportergenen in der Lichtphase im Tagesgang	67
3.4.3	Einfluß verschiedener Stickstoffquellen auf die Expression von Nitrattransportergenen in Tomatenwurzeln	69
3.4.4	RT-PCR-Nachweis von Nitrattransportertranskripten in oberirdischen Pflanzenteilen von Tomate	72
3.5	Lokalisierung von Nitrattransportertranskripten in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen	76
3.5.1	Lokalisierung der Transkripte von low- und high-affinity Nitrattransportergenen in Tomatenwurzeln	76
3.5.2	Lokalisierung der Transkripte von low- und high-affinity Nitrattransportergenen in mykorrhizierten Tomatenwurzeln	79
3.5.3	Lokalisierung von Nitrattransportertranskripten in Geweben oberirdischer Pflanzenteile von Tomate	82
3.6	Northern-Analysen zur Untersuchung der Expression von Nitrattransportergenen in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln	82

3.7 Expression von Nitratreduktase- und Nitritreduktasegenen von Tomate in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen 85

3.8 Expression des Nitratreduktasegens von *Glomus intraradices* Sy167 in mykorrhizierten Tomatenwurzeln 85

3.9 Bestimmung der Nitratreduktaseaktivität in Rohextrakten von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen sowie in Rohextrakten aus extraradikalem Myzel (ERM) von *Glomus intraradices* Sy167 87

3.10 RT-PCR-Nachweis von Nitratreduktasetranskripten mit RNA aus extraradikalem Myzel (ERM) von *Glomus intraradices* Sy167 88

3.11 Einsatz einer rRNA-Sonde zur Abschätzung des rRNA-Anteils von *Glomus intraradices* Sy167 an der Gesamt-RNA mykorrhizierter Tomatenwurzeln 91

3.11.1 RNA-Dot-Blot-Analysen zur Abschätzung des pilzlichen rRNA-Anteils an der Gesamt-RNA mykorrhizierter Tomatenwurzeln 92

3.12 Wachstum von AM-Pilzen ohne Wirt 94

4 Diskussion 101

4.1 Eigenschaften der zur Herstellung von Gensonden amplifizierten Bereiche aus Nitrattransporter-, Nitratreduktase- und Nitritreduktasegenen 101

4.2 *Tomate-lo1*, *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* sind durch Nitrat induzierbar 104

4.3 Expression der Nitrattransportergene *Tomate-lo1* und *Tomate-hi3* sowie des Nitratreduktase- und eines Nitritreduktasegens von Tomate im Tagesgang 105

4.4 Einfluß verschiedener Stickstoffquellen auf die Expression von Nitrattransportergenen, des Nitratreduktase- und eines Nitritreduktasegens in Tomatenwurzeln 106

4.5 Lokalisierung der Transkripte von *Tomate-lo1* und *Tomate-hi3* in Tomatenwurzeln 111

4.6 *Tomate-lo1*, *Tomate-lo2*, *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* werden auch in oberirdischen Pflanzenteilen exprimiert 112

4.7 Expression von Nitrattransportergenen in der arbuskulären Mykorrhiza 114

4.8 Expression von Nitrat- und Nitritreduktasegenen in der arbuskulären Mykorrhiza 116

4.9 Abschätzung des pilzlichen rRNA-Anteils an der Gesamt-RNA mykorrhizierter Tomatenwurzeln 119

4.10 Wachstum von *Glomus intraradices* ohne Wirt 121

4.11 Ausblick auf weitere Untersuchungen 124

5 Zusammenfassung 127

6 Literaturverzeichnis 130

7 Anhang 150

7.1 Abkürzungsverzeichnis 150

7.2 DNA-Sequenzen 152

1.Einleitung

1.1 Mykorrhiza

Der als Sammelbegriff für mehrere unterschiedliche Formen des symbiotischen Zusammenlebens von Landpflanzen und Pilzen gebräuchliche Ausdruck Mykorrhiza setzt sich aus den griechischen Wörtern *mikès* (Pilz) und *rhiza* (Wurzel) zusammen und wurde erstmalig von Frank (1885) zur Bezeichnung der Symbiose zwischen Bäumen und Pilzen verwendet („Mycorhiza“). Aufgrund morphologischer Kriterien werden endo- und ektotrophe Mykorrhizen unterschieden. Die von Frank (1885) beschriebene Symbiose wird heute als ektotrophe - oder Ektomykorrhiza bezeichnet. Bei der ektotrophen Mykorrhiza bilden die Pilzhyphen eine Art Mantel, der die Wurzeln umgibt, sowie ein dichtes Hyphengeflecht zwischen den Wurzelrindenzellen, das als Hartigsches Netz (Hartig, 1851) bezeichnet wird. Dabei bleiben die Pilzhyphen von wenigen Ausnahmen abgesehen extrazellulär (Werner, 1987).

Bei den endotrophen Mykorrhizen können die Pilzhyphen in Pflanzenzellen eindringen ohne jedoch das Plasmalemma zu überschreiten. Diese Gruppe wird im wesentlichen in drei Unterformen gegliedert (Werner, 1987): 1. die Orchideenmykorrhiza, 2. die Ericaceenmykorrhiza und 3. die arbuskuläre Mykorrhiza (AM). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen befassen sich ausschließlich mit den letztgenannten AM-Pilzen.

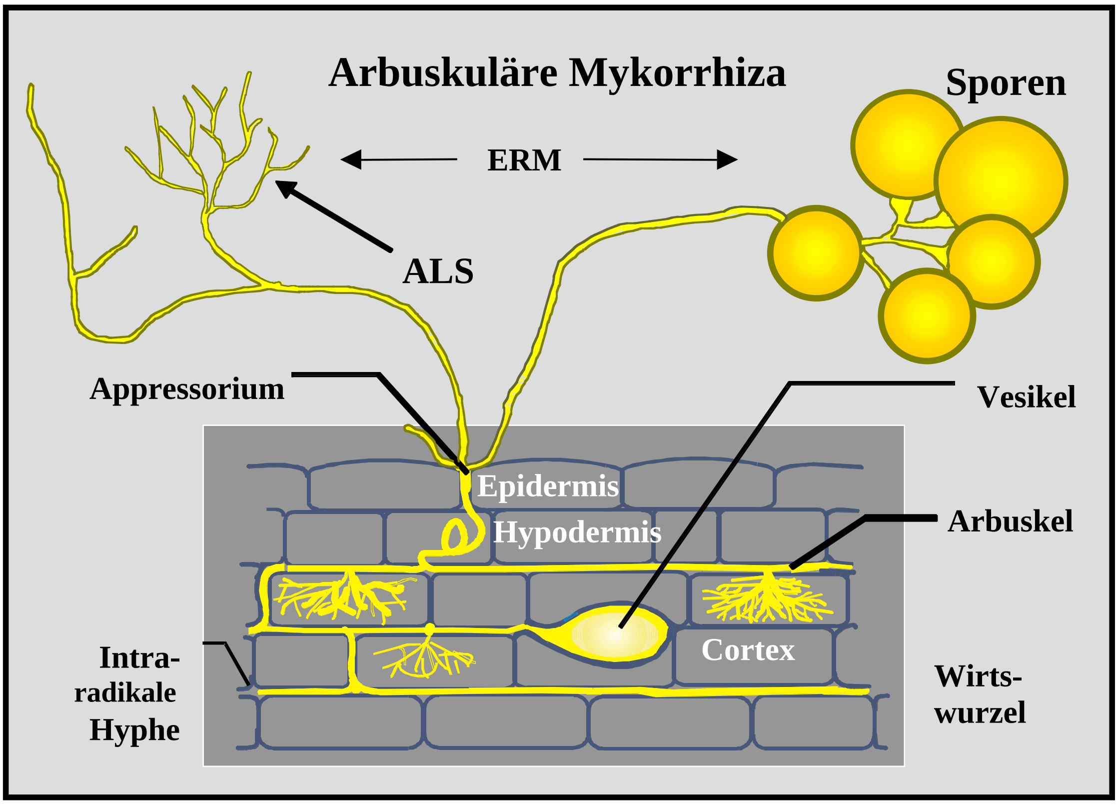
Die weltweit verbreiteten AM-Pilze gehören zur Klasse der Zygomycetes und werden in der eigenen Ordnung Glomales zusammengefaßt. Sechs beschriebene Gattungen mit derzeit insgesamt etwa 160 Arten werden in drei Familien unterteilt (Morton, 1990; Simon et al., 1993; Simon, 1996): 1. Acaulosporaceae (*Acaulospora*, *Enterophospora*), 2. Gigasporaceae (*Gigaspora*, *Scutellospora*) und 3. Glomaceae (*Glomus*, *Sclerocystis*). Die Taxonomie beruht dabei im wesentlichen auf den morphologischen Charakteristika der Sporen (Walker und Trappe, 1993). Molekularbiologische Untersuchungen, wie die Sequenzanalyse der 18S-rDNA, deuten allerdings an, daß es sich bei der Gattung *Glomus* möglicherweise um ein polyphyletisches Konglomerat verschiedener Linien handeln könnte (Simon et al, 1993; Gehrig et al., 1996; Redecker et al., 2000). Somit wäre eine Charakterisierung hinsichtlich morphologischer Merkmale nicht ausreichend.

Die arbuskuläre Mykorrhiza ist die weitverbreitetste Symbiose überhaupt (Hayman, 1982). So sind über 80% aller höheren Pflanzen potentielle Wirte von AM-Pilzen. Im allgemeinen wird die Wirtsspezifität der AM-Pilze als gering beschrieben (Werner, 1987). Nur von wenigen Pflanzenfamilien, wie den Brassicaceae, den Chenopodiaceae und den Cyperaceae, ist bekannt, daß diese am natürlichen Standort nicht oder nur in geringem Maße mykorrhiziert vorkommen (Harley und Smith, 1983; Peat und Fitter, 1993). Die arbuskuläre Mykorrhiza gilt als eine der ältesten Symbiosen. So konnten den heute existierenden Mykorrhizastrukturen der Gattung *Glomus* stark ähnelnde Pilzinfektionen anhand fossiler Funde aus dem Devon (400 Mio. Jahre) in *Rhynia* und anderen Psilophytales nachgewiesen werden (Pyrozynski, 1981; Webster, 1983). Dabei wird eine Funktion der AM bei der Entstehung der Landpflanzen im Devon diskutiert (Simon et al., 1993).

Arbuskuläre Mykorrhizapilze sind obligat biotrophe Symbionten, d.h. sie sind zur Vollendung ihres Lebenszyklus auf eine Kolonisierung von Wirtswurzeln und eine damit einhergehende Versorgung mit Kohlenhydraten durch den pflanzlichen Partner angewiesen. Dabei spielt vermutlich der Transfer von Hexosen eine wichtige Rolle (Pfeffer et al., 1999). In axenischer Kultur, d.h. in Abwesenheit eines Wirtes, können AM-Pilze, ausgehend von keimenden Sporen, ein Myzel von nur wenigen Zentimetern Länge ausbilden (Mosse, 1987).

Die Kolonisierung von Wurzeln durch AM-Pilze besteht aus einer komplexen Interaktion zwischen AM-Pilz, Pflanze und anderen Mikroorganismen. Sowohl Bodenextrakte (Daniels und Graham, 1976), Wurzelexsudate, CO_2 und Bodenbakterien (Elias et al., 1987; Bécard und Piché, 1989b; Fester et al., 1999) sind in der Lage, das Wachstum von AM-Pilzen zu stimulieren, ermöglichen jedoch kein unbegrenztes Wachstum des Myzels. Die Erkennung von Wirtspflanzen durch AM-Pilze beruht auf der Abgabe von Signalsubstanzen durch die Wurzeln der potentiellen Wirtspflanzen. Diese bislang nicht identifizierten Substanzen führen nach Keimung der AM-Sporen zum Übergang von der präsymbiotischen zur symbiotischen Phase im Lebenszyklus der AM-Pilze und damit einhergehend zu einer Veränderung der Hyphenmorphologie. Diese Veränderungen lassen sich in der Umgebung von Nicht-Wirtspflanzen wie z.B. *Brassica oleracea* nicht beobachten (Giovanetti et al., 1994). Mit Flavonoiden aus Luzerne konnte eine Stimulation des Wachstums von AM-Pilzen beobachtet werden (Tsai und Phillips, 1991; Bécard et al., 1992). Flavonoide sind jedoch in der arbuskulären Mykorrhiza für eine Kommunikation zwischen Makro- und Mikrosymbiont nicht unbedingt erforderlich, wie dies in der Symbiose zwischen Rhizobium und Leguminosen der Fall ist (Bécard et al., 1995).

Abbildung 1:



Schematische Darstellung der Strukturen der arbuskulären Mykorrhiza. ALS: Arbuskel-ähnliche Struktur; ERM: Extraradikales Myzel

Nach erfolgreicher Infektion der Wurzel über Appressorien breiten sich die Hyphen interzellulär in der Wurzelrinde aus. Dort differenzieren die intraradikalen Hyphen, d.h. die Hyphen, die sich innerhalb der Wurzel ausbreiten, in die für AM-Pilze charakteristischen Strukturen: Arbuskeln und Vesikel (Abb. 1). Bei den bäumchenartig fein verzweigten Arbuskeln handelt es sich um den Ort des intensivsten Stoffaustausches zwischen Pilz und Pflanze (Cox und Tinker, 1976; Bonfante-Fasolo, 1984; Gianinazzi-Pearson, 1996). Die Arbuskeln füllen einen großen Teil der Wirtszellen im Cortex der Wurzel aus, dabei

durchdringt der pilzliche Symbiosepartner zwar die Zellwand, nicht aber das Plasmalemma der Wirtszellen (Harley und Smith, 1983). In den Arbuskel-enthaltenden Zellen kommt es zu erheblichen cytologischen Modifikationen. Die *De-novo*-Synthese der die Arbuskeln umgebenden periarbuskulären Membran (PAM), die aus der Plasmamembran der Zelle hervorgeht, führt zur Ausbildung einer apoplasmatischen symbiotischen Matrix zwischen Pilz und Pflanze, die dem Nährstoffaustausch der beiden Symbiosepartner dient (Gianinazzi-Pearson, 1996). Bei den Arbuskeln handelt es sich um relativ kurzlebige Strukturen, die innerhalb weniger Tage ausgebildet werden und wieder degenerieren (Alexander et al., 1988). Die meisten AM-Pilze bilden innerhalb der Wurzel Hyphenanschwellungen, sogenannte Vesikel, die zur Speicherung von Lipiden dienen sollen (Werner, 1987). Die Ausbildung von Arbuskeln und Vesikel im Verlauf der Mykorrhizierung stellt einen dynamischen Prozeß dar. Im zeitlichen Verlauf der Kolonisierung werden die Arbuskeln kontinuierlich neu gebildet. Erst gegen Ende der Vegetationsperiode kommt es dann zu einer deutlich verringerten Neubildung von Arbuskeln. Die Anzahl von Vesikeln nimmt hingegen im Verlauf der Kolonisierung ständig zu. Der Anteil der AM-Pilze an der Biomasse mykorrhizierter Wurzeln ist abhängig vom Grad der Mykorrhizierung und kann zwischen 4 bis 20% liegen (Hepper, 1977).

Trotz der massiven pilzlichen Kolonisierung der Wirtswurzel kommt es in nur sehr begrenztem Umfang zur Ausbildung von pflanzlichen Abwehrreaktionen. In nicht-mykorrhizierbaren (*myc*$^{-}$) Pflanzenmutanten hingegen werden durch AM-Pilze starke pflanzliche Abwehrreaktionen ausgelöst, die darauf hindeuten, daß die *myc*$^{-}$ Pflanzen AM-Pilze nicht mehr als Symbionten sondern als Pathogene erkennen. Inwieweit die reduzierte Pflanzenabwehr an einer Kontrolle der Entwicklung des pilzlichen Symbionten beteiligt ist, kann derzeit noch nicht beantwortet werden (Gianinazzi-Pearson et al., 1996).

Gleichzeitig mit Wachstum und Ausbreitung der AM-Strukturen innerhalb der Wirtswurzel kommt es außerhalb zur Ausbildung des extraradikalen Myzels (ERM). Dieses bildet im Boden ein weitverzweigtes Netzwerk (Giovannetti et al., 1999) und ermöglicht dem AM-Pilz Zugang zu weiter entfernten Bereichen des Bodens, die von der Pflanze allein nicht erreicht werden können.

Der geringe Hyphendurchmesser (bis 1 µm) ermöglicht den Hyphen das Eindringen in feinste Bodenpartikel. Aufgrund der großen Hyphenoberfläche des ERM können dort sehr viel effizienter, als die Pflanzen mit ihren Wurzeln dazu in der Lage wären, Nährstoffe aufgenommen und zur Wirtspflanze transportiert werden. Die durchschnittliche Länge von AM-Hyphen x g^{-1} Boden beträgt etwa 1-20 m (Sylvia, 1990). Dabei verbinden die AM-Pilze nicht nur die Wirtspflanzen mit weiter entfernten Bodenbereichen, sondern vernetzen gleichzeitig die Wirtspflanzen untereinander. Von Newman et al. (1992) konnte der Transport von Stickstoff zwischen einzelnen Pflanzen (*Plantago lanceolata*) über die Hyphen von AM-Pilzen nachgewiesen werden. Solche Verbindungen könnten in vielen Habitaten von großer ökologischer Bedeutung sein (Read, 1997).

Der Lebenszyklus von AM-Pilzen schließt sich mit beginnender Ausbildung von Sporen (Bago et al, 1998a). Die vermutlich asexuell gebildeten Sporen der AM-Pilze dienen der Überdauerung und Vermehrung und enthalten je bis zu mehrere tausend Kerne (Hosny et al., 1998; Viera und Glenn, 1990). Über das genetische System der AM-Pilze gibt es nur wenige Informationen. Es wird vermutet, daß sich AM-Pilze ausschließlich asexuell fortpflanzen. Inwieweit und ob sie eine genetische Rekombination aufweisen, ist derzeit nicht bekannt.

Nur wenige Wirtspflanzen, wie z.B. *Coffea arabica,* sind auf AM-Symbionten angewiesen und werden daher als obligat mykotroph bezeichnet (Werner, 1987). Die meisten Pflanzen sind jedoch fakultativ mykotroph, d.h. sie profitieren dann von einer Mykorrhizierung, wenn eine Nährstofflimitation oder verschiedene Streßfaktoren vorliegen. In nährstoffli-

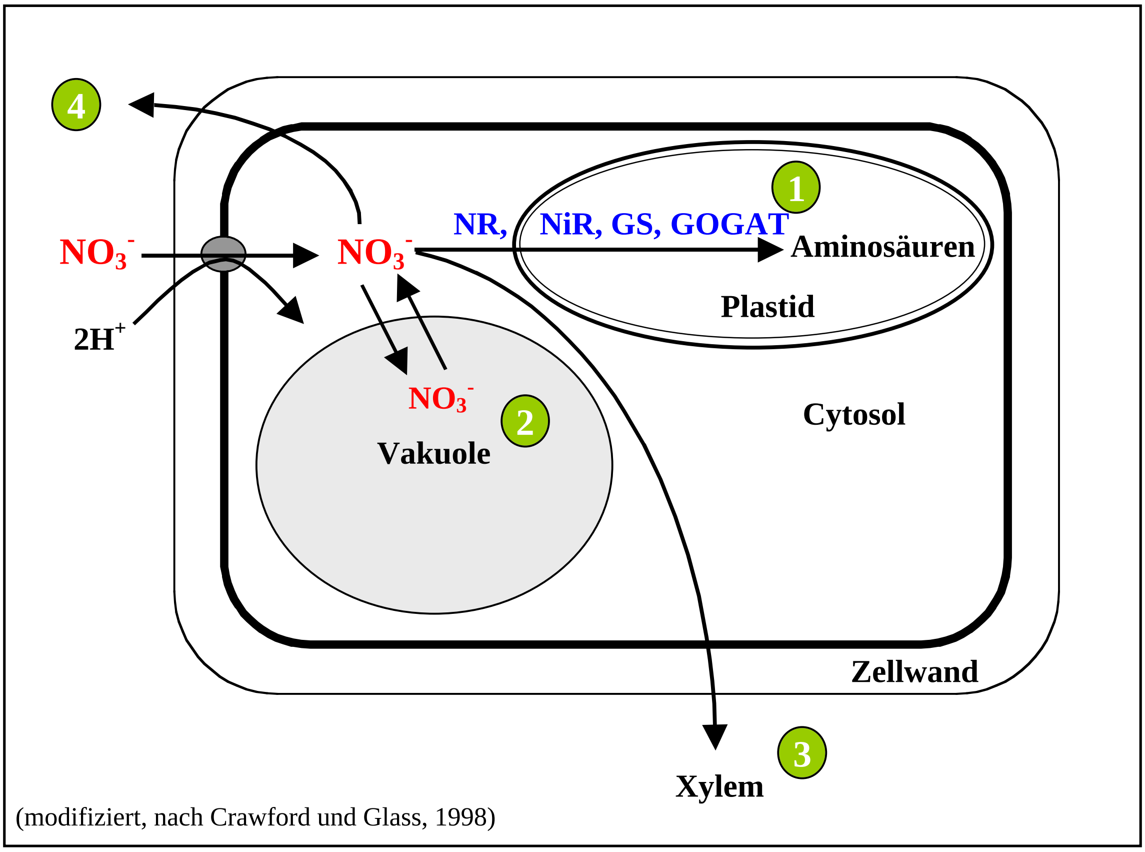
mitierten Böden werden mykorrhizierte Pflanzen besser ernährt und zeigen ein gesteigertes Wachstum im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen (Gerdemann, 1964). Ein wichtiger Faktor ist dabei die verbesserte Versorgung der Wirtspflanze mit Phosphat. In Böden mit limitierendem Phosphatgehalt sind AM-Pilze in der Lage, Phosphat aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten aufzunehmen, über die Hyphen zur Wurzel zu transportieren und dort an die Pflanzen abzugeben (Smith und Gianinazzi-Pearson, 1988). Harrison und van Buuren (1995) konnten einen Phosphattransporter aus *Glomus versiforme* klonieren, der vermutlich unmittelbar an der Aufnahme von Phosphat aus dem Boden beteiligt ist. Die weitere mögliche Beteiligung eines pflanzlichen Phosphattransporters an der Aufnahme von Phosphat an den Arbuskel-enthaltenden Zellen konnte kürzlich von Rosewarne et al. (1999) gezeigt werden.
Ein erhöhter Phosphatgehalt führt neben einer Förderung des Pflanzenwachstums zu einer verstärkten Trockentoleranz der mykorrhizierten Pflanzen (Nelsen und Safir, 1982). Neben der verstärkten Phosphataufnahme können AM-Pilze auch die Versorgung ihrer Wirtspflanzen mit Mikronährelementen wie Calcium, Eisen, Kalium, Kupfer und Zink verbessern (Kothari et al., 1991; Khaliel, 1993). Als weitere wichtige Faktoren sind eine durch die AM-Pilze erleichterte Wasseraufnahme (Kothari et al., 1990), eine erhöhte Toleranz gegenüber Salz- und Schwermetallstreß (Pond et al., 1984; Hildebrandt et al., 1999; Kaldorf et al., 1999) sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber pathogenen Pilzen und Nematoden anzuführen (Dehne, 1982). Der Hauptvorteil für den pilzlichen Symbiosepartner liegt zum einen in der Einnahme einer ökologischen Nische und zum anderen in der Versorgung mit bis zu 20% des von der Wirtspflanze fixierten Kohlenstoffs (Hayman, 1982; Jakobsen und Rosendahl, 1990).
Mykorrhizierung beeinflußt nicht nur die Versorgung der Pflanzen mit Nährstoffen, sondern führt bei einigen Substanzen zu signifikanten Konzentrationsänderungen in den AM-kolonisierten Pflanzenwurzeln. Dies konnte sowohl für Phytohormone (Danneberg et al., 1992; Kaldorf et al., 2000) als auch für den Sterolgehalt mykorrhizierter Wurzeln (Schmitz et al., 1991) gezeigt werden. Darüber hinaus wird bei Poaceen infolge Mykorrhizierung mit AM-Pilzen die Bildung von Mykorradicin, einem Carotinoid (Klingner et al., 1995), und von Blumenin, einem Cyclohexenon-Derivat (Maier et al., 1995), beschrieben. Die Funktionen der genannten Substanzen innerhalb der Symbiose konnten bisher nicht aufgeklärt werden.

1.2 N-Assimilation

Der Einfluß einer Mykorrhizierung mit AM-Pilzen auf die Stickstoffversorgung der Wirtspflanze wurde von verschieden Gruppen untersucht. Einige dieser Untersuchungen (Tobar et al., 1994; Subramanian und Charest, 1998; Kaldorf et al., 1998) deuten darauf hin, daß die Kolonisierung mit AM-Pilzen zu einer verstärkten Aufnahme bzw. Assimilation von Stickstoff führt.
In den meisten Böden stehen den Pflanzen im wesentlichen NH_4^+ und NO_3^- als Stickstoffquelle zur Verfügung. Die durchschnittlichen Ammoniumkonzentrationen liegen dabei 10-1000fach unter den vorliegenden Nitratkonzentrationen (Marschner, 1995). Das wenig mobile NH_4^+ wird jedoch bevorzugt aufgenommen, da im Vergleich zu NO_3^-, das zunächst reduziert werden muß, insgesamt weniger Energie für die Assimilation aufzuwenden ist. Liegt Ammonium als einzige Stickstoffquelle vor, können durchaus negative Effekte auf das Pflanzenwachstum beobachtet werden, die durch das Fehlen von NO_3^- und dessen Funktionen als Osmotikum, Gegenion und Regulator bedingt sind (von Wirén et al., 2000; Stitt, 1999).

In den meisten Böden ist das mobile Nitrat die Hauptform des pflanzenverfügbaren Stickstoffs. Daher ist neben vielen anderen Faktoren wie Licht oder Temperatur (Hoff et al., 1992; Oaks, 1994; Wolt, 1994) die Aufnahme von Nitrat durch die Pflanze ein bestimmender Faktor der Nitratassimilation. Die Nitrataufnahme aus der Bodenlösung erfolgt dabei in Wurzeln über die Plasmamembran von Zellen der Rhizodermis und des Cortex. NO_3^- wird über einen Protonen-Symport Mechanismus ($2H^+:1NO_3^-$) aufgenommen (Abb. 2), der von der Aktivität der Plasmamembran H^+-ATPase abhängig ist (McClure et al., 1990). In Wurzeln gibt es mindestens zwei unterschiedliche Nitrataufnahmesysteme, die sich hinsichtlich ihrer kinetischen Charakteristika unterscheiden: Konstitutive und durch Nitrat induzierbare high-affinity Aufnahmesysteme (K_m: 6-20 µM bzw. K_m: 20-100 µM) sowie induzierbare und konstitutive low-affinity Aufnahmesysteme (K_m: 5 mM). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren aus höheren Pflanzen bereits Komponenten des low-affinity Nitrataufnahme-Systems und des induzierbaren high-affinity Nitrataufnahme-Systems identifiziert, die wiederum Bestandteile zweier unterschiedlicher Nitrattransportergenfamilien sind, der NRT1- (= low-affinity Nitrattransporter) und der NRT2- (= high-affinity Nitrattransporter) -Familie (Crawford und Glass, 1998). Die Proteine beider Familien sind typische Membrantransporter mit vermutlich zwölf membranspannenden Helices. Die Regulation der Nitrat-Aufnahme erfolgt im wesentlichen durch Nitrat und den N-Status der Pflanze (Forde, 2000).

Abbildung 2: Wege des Nitrat in der Zelle



Legende zu Abbildung 2:
Nitrat wird aus der Bodenlösung im Protonensymport durch low- und high-affinity Nitrattransporter über die Plasmamembran in die Zelle transportiert. Dort kann es über die Enzyme der Nitratassimilation in Aminosäuren eingebaut (1), in die Vakuole transportiert und dort gelagert (2) oder über einen symplasmatischen Transport von Zelle zu Zelle an das Xylem abgegeben und in den Sproß transportiert werden (3). Nitrat kann des weiteren einem Efflux aus der Zelle unterliegen (4).

Innerhalb der Zelle wird Nitrat durch die assimilatorische Nitratreduktase (NR) zu Nitrit und weiter durch die assimilatorische Nitritreduktase (NiR) zu Ammonium reduziert (Abb. 2). Die eukaryontischen Nitratreduktasen werden in Abhängigkeit von den verschiedenen Elektronendonoren in drei Gruppen unterteilt: NADH-spezifische (EC 1.6.6.1) und NAD(P)H-bispezifische (EC 1.6.6.2) in Algen und höheren Pflanzen, sowie NADPH-spezifische (EC 1.6.6.3) Nitratreduktasen in Pilzen (Guerrero et al., 1981; Zhou und Kleinhofs, 1996). Da bislang Untersuchungen zur Nitratreduktion bei Pilzen überwiegend mit den Ascomyceten *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* durchgeführt wurden (Marzluf, 1997), die NADPH-spezifische Nitratreduktasen aufweisen, ist die Verbreitung der anderen NR-Typen in Pilzen bislang unklar. Die assimilatorische NR höherer Pflanzen ist kernkodiert und liegt im Cytoplasma als Homodimer mit Untereinheiten von 100-120 kDa vor, von denen jede die drei prosthetischen Gruppen Molybdän-Cofaktor, Haem und FAD enthält. In Tomate gibt es nur ein Gen für das Apoenzym der NR (Daniel-Vedele et al., 1989), wohingegen z.B. in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* zwei unterschiedliche Gene vorhanden sind (Zhou und Kleinhofs, 1996). Die pflanzliche NR unterliegt auf Ebene der Genexpression und der posttranslationalen Modifikation durch Faktoren wie Nitrat, Licht, N-Metabolite und Phytohormone einer komplexen Regulation (Bothe, 1993; Kaiser et al., 1999).
Die in höheren Pflanzen kernkodierten jedoch plastidär lokalisierten Nitritreduktasen (EC 1.7.7.1) sind monomere Enzyme (63 kDa) und enthalten Sirohaem und ein 4Fe-4S-Zentrum als prosthetische Gruppen. In *Nicotiana tabacum* konnten vier unterschiedliche Nitritreduktasegene nachgewiesen werden (Kronenberger et al., 1993), während in Spinat nur ein Gen pro haploidem Genom vorliegt (Wray und Ward, 1994).

Die Regulation der NiR-Genexpression erfolgt im wesentlichen durch Faktoren wie Nitrat, Licht, und Phytochrom (Crawford und Arst, 1993). Eine Endprodukthemmung durch N-Metabolite wurde beschrieben (Vincentz et al., 1993).
Die weitere Assimilation in Aminosäuren erfolgt vorwiegend über die Glutamin-Synthetase (GS) und die Glutamatsynthase (GOGAT). Der Weg über die Glutamatdehydrogenase (GDH) ist dabei in höheren Pflanzen von untergeordneter Bedeutung (Oaks, 1994). Die Reaktionsprodukte Glutamin und Glutamat nehmen eine zentrale Position im Stickstoffmetabolismus ein. In der Wurzel wird das aufgenommene Nitrat jedoch überwiegend in die Vakuole transportiert und dort gelagert oder zum Transport in die Blätter an das Xylem abgegeben. Der überwiegende Teil der Nitratassimilation findet in der Regel nicht in den Wurzeln, sondern im Sproß statt (Campbell, 1988; Oaks, 1994). Über die Natur der an den Transportprozessen an der Tonoplastenmembran und am Efflux von Nitrat über die Plasmamembran beteiligten Nitrattransporter ist bislang nichts bekannt.

Wurzeln können insbesondere bei ausreichender Bodenfeuchte sowohl Ammonium, welches zu einem großen Teil an Bodenpartikel gebunden vorliegt, als auch Nitrat, das leicht löslich und mobil ist, effektiv aus der Rhizosphäre aufnehmen. Mit der Zeit entsteht in der Rhizosphäre eine Zone mit reduziertem Stickstoffangebot. Während Nitrat relativ schnell nachfließen kann, ist aufgrund der geringen Mobilität des Ammoniumions ein Ausgleich dieses Mangels nur bedingt möglich (Ames et al., 1983). Daher wurde angenommen, daß AM-Pilze mit großer Wahrscheinlichkeit die Ammoniumversorgung der Wirtspflanze, nicht aber deren Versorgung mit Nitrat wesentlich beeinflussen können (Barea, 1987). Diese Annahme konnte nicht aufrecht erhalten werden, da Untersuchungen mit ^{15}N zeigten, daß AM-Pilze in der Lage sind, effektiv NH_4^+ <u>und</u> NO_3^- aufzunehmen (George et al., 1992; Johansen et al., 1996) , weiter zu reduzieren und über das extraradikale Myzel, insbesondere unter Wassermangelbedingungen, zur Wirtspflanze zu transportieren (Frey und Schüepp, 1993; Tobar et al., 1994 a,b; Subramanian und Charest, 1999). Die aktive

Aufnahme von Nitrat in monoxenischer Kultur mit Ri T-DNA transformierten Karottenwurzeln konnte von Bago et al. (1996) nachgewiesen werden. Über ihr weitverzweigtes Myzel besitzen AM-Pilze damit Zugang zu Stickstoffreserven des Bodens, die für Nicht-AM-Pflanzen unzugänglich sind (Tobar et al., 1994 a,b). Cliquet und Stewart (1993) konnten zeigen, daß die Aktivitäten von Nitratreduktase (NR) und Glutamin-Synthetase (GS) bei mit *Glomus fasciculatum* mykorrhizierten Maispflanzen in Sproß und Wurzeln deutlich erhöht waren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß das vom AM-Pilz aufgenommene Nitrat direkt an die Wirtspflanze weitergegeben wird, um dann dort zu erhöhten Aktivitäten der an der Nitratassimilation beteiligten Enzyme zu führen. Kaldorf et al. (1998) hingegen konnten eine deutliche Reduktion der NR-Aktivität in Blättern von mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Maispflanzen im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen zeigen. Darüber hinaus konnte Nitratreduktase-mRNA von *Glomus intraradices* in den mykorrhizierten Maiswurzeln nachgewiesen werden (Kaldorf et al., 1998). Diese Resultate deuten darauf hin, daß die pilzliche Nitratreduktase einen Teil der Nitratassimilation für die Pflanze übernimmt und daraus die reduzierte NR-Aktivität der Maispflanzen resultiert. In weiteren Untersuchungen konnten in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung mit AM-Pilzen sowohl erhöhte (Azcón et al., 1992; Mathur und Vyas, 1995) als auch erniedrigte NR-Aktivitäten (Oliver et al., 1983) ermittelt werden. McArthur und Knowles (1993) und Thapar et al. (1990) fanden keine unterschiedlichen Nitratreduktaseaktivitäten in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen.

Bisher konnten somit keine eindeutigen Aussagen gemacht werden, in welcher Art und Weise der pilzliche Symbiont an der Nitratassimilation des pflanzlichen Partners beteiligt ist.

Durch die Identifizierung von Nitrattransportergenen aus höheren Pflanzen, deren Genprodukte für die Aufnahme von Nitrat verantwortlich sind (Tsay et al., 1993; Trueman et al., 1996), besteht jetzt die direkte Möglichkeit mit molekularbiologischen Methoden den Einfluß einer Mykorrhizierung mit AM-Pilzen auf die Expression von Nitrattransportergenen der Wirtspflanze zu untersuchen.

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige Sequenzdaten zu Nitrattransportern in höheren Pflanzen und Pilzen verfügbar. Als erste Sequenz eines Nitrattransporters aus höheren Pflanzen war *CHL1* als Bestandteil des low-affinity-Transportsystems in *Arabidopsis thaliana* identifiziert worden (Tsay et al., 1993). Im weiteren lagen zwei zu *CHL1* homologe cDNA-Sequenzen aus Tomate vor: *LeNRT1;1* und *LeNRT1;2* (Lauter et al., 1996) und eine Sequenz aus *Brassica napus*: *BnNRT1* (Muldin und Ingemarsson, 1995). Die ersten Sequenzen von Homologen aus höheren Pflanzen zu den high-affinity-Nitrattransportern aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und aus dem Pilz *Aspergillus nidulans* (Quesada et al., 1994; Unkles et al., 1991) konnten von Trueman et al. (1996) aus Gerste (*HvNRT2;1* und *HvNRT2;2*) und von Quesada et al. (1997) aus *Nicotiana plumbaginifolia* (*NpNRT2;1*) kloniert werden.

Durch Entwicklung von Gensonden für low- und high-affinity Nitrattransporter aus Tomate, anschließende Transkriptanalysen von Nitrattransporter-, Nitrat- und Nitritreduktasegenen sowie RNA-*In situ*-Hybridisierungen im Vergleich von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen, sollte versucht werden, die Auswirkungen einer möglichen Beteiligung von AM-Pilzen an der Nitratassimilation in der Symbiose zu dokumentieren. Über diese Untersuchungen wird in der vorliegenden Arbeit berichtet.

1.3 Axenische Kultur von AM-Pilzen

Die obligat biotrophe Lebensweise der AM-Pilze behindert molekularbiologische und biochemische Untersuchungen der Eigenschaften dieser Pilze. Ein Großteil der Hyphen und die namensgebenden Strukturen der AM-Pilze, Arbuskeln und Vesikel befinden sich in engem Kontakt mit Pflanzenzellen innerhalb von Wurzeln und sind so kaum zugänglich (Jabaji-Hare et al., 1984). Das den Boden durchdringende extraradikale Myzel ist ebenfalls nur in sehr begrenztem Maße zugänglich, zumal längere intakte Hyphen nur als Bruchstücke aus Bodensubstraten isoliert werden können (Horn et al., 1992). Die Entwicklung eines kompartimentierten Kultursystems, das eine Trennung des extraradikalen Myzels von den Wurzeln der Wirtspflanze durch ein feinmaschiges Netz erlaubt, erleichterte vor allem Transportuntersuchungen mit radioaktiv markierten Substanzen und ermöglichte die Isolierung größerer Mengen extraradikalen Myzels für biochemische Untersuchungen. In den letzten Jahren konnten durch die Etablierung eines dualen monoxenischen Kultursystems mit Ri T-DNA transformierten Karottenwurzeln (Bécard und Fortin, 1988) Einblicke in Lebenszyklus, Physiologie und Nährstoffaufnahme von AM-Pilzen erhalten werden (Chabot et al., 1992; Johansen et al., 1996; Pfeffer et al., 1999), wie dies mit herkömmlicher Topfkultur nicht möglich gewesen wäre. Allerdings ist dieses Kultursystem aufgrund seiner Beschränkung auf transformierte Wurzeln nicht mit den physiologischen Bedingungen einer grünen, im Boden wurzelnden Pflanze vergleichbar.
Das Ziel vieler Bemühungen der letzten Jahrzehnte war jedoch, AM-Pilze in axenischer Kultur, in Abwesenheit von lebenden Wirtswurzeln, vermehren zu können. Eine axenische Kultur würde weitergehende biochemische und molekularbiologische Untersuchungen, insbesondere aber die Selektion bestimmter Isolate, auch im Hinblick auf eine mögliche genetische Transformation von AM-Pilzen, erlauben. Neben dem wissenschaftlichen gibt es durchaus ein mittlerweile stark gestiegenes wirtschaftliches Interesse an einer axenischen Kultur von AM-Pilzen, während im Gartenbau ein verstärktes Interesse an den positiven Effekten einer Mykorrhizierung durch AM-Pilze besteht. Die Produktion von Inokulum ist trotz der Entwicklung aeroponischer, oder auf der Karottenwurzelkultur beruhender Vermehrungssysteme immer noch relativ teuer und nicht standardisiert. Eine effektive axenische Kultur unter kontrollierten Bedingungen könnte die Produktion von Inokulum hoher Qualität ohne mikrobielle Kontamination gewährleisten.
Unterschiedlichste Substanzen (Wurzelexsudate, Pflanzenextrakte etc.) und Mikroorganismen wurden in ihrer Wirkung auf AM-Pilze untersucht. Es konnten zwar wachstumsstimulierende Faktoren ausgemacht werden, diese erlaubten jedoch kein unbegrenztes Wachstum oder die Vollendung des pilzlichen Lebenszyklus mit der Bildung von Sporen.
In der vorliegenden Arbeit werden Effekte auf das Wachstum von *Glomus intraradices* Sy167 durch Co-Kultur mit einem AM-assoziierten Bodenbakterium beschrieben. Diese könnten zu neuen Ansätzen bei der Etablierung einer Kultur von AM-Pilzen ohne Wirtswurzeln führen.

2.Material und Methoden

2.1. Versuchsobjekte

2.1.1 Organismen

Als Versuchspflanze wurde verwendet:
Tomate: *Lycopersicon esculentum* MILL. var. Tamina, GS (Schmitz und Laux, Hilden)

Zur Isolierung von DNA wurden ferner verwendet:
Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH.
Nicotiana plumbaginifolia VIV.
Zea mays L. cv. Honeycomb

Zur dualen monoxenischen Kultur von arbuskulären Mykorrhizapilzen (AM) wurde eine mit Ri T-DNA aus *Agrobacterium rhizogenes* transformierte Wurzelkultur von *Daucus carota* L. (Ausgangskultur von G. Bécard, CRBF, Quebec, Kanada) eingesetzt (siehe Kapitel 2.1.4.1).

Tomatenpflanzen wurden mit einem arbuskulären Mykorrhizapilz der Gattung *Glomus* (*Glomus intraradices* Schenck & Smith INVAM Sy167, isoliert in Syrien) inokuliert (siehe Abschnitt 2.1.6).

Tagetes patula L. "Bonita del Sol", bezogen von Samen Walz, Stuttgart, wurde als Wirtspflanze zur Inokulumproduktion, d.h. für die Vermehrung der AM-Pilze eingesetzt. Nähere Informationen zur Inokulumproduktion sind in Abschnitt 2.1.5 aufgeführt.

Für Transformationen wurde eingesetzt:
Escherichia coli XL1-Blue (*supE*44 *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*46*thi relA*1 lac^{-}) F´[$proAB^{+}$ $laqI^{q}$ *lacZ* ΔM15Tn10(tet^{r})] (Sambrook et al., 1989, Quelle: Stratagene, Heidelberg)

Die Anzucht der *E.coli*-Stämme erfolgte ausgehend von Glycerin-Kulturen (50% Glycerin, 50% Übernachtkultur, Lagerung bei –70°C) oder ausgehend von LB-Platten (Kapitel 2.2.5) in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsagens (siehe Abschnitt 2.4.3).

2.1.2 Oberflächensterilisierung von Saatgut

Zur Oberflächensterilisierung wurden die verwendeten Pflanzensamen jeweils 5 min mit 70% EtOH und 0.1% $HgCl_2$ behandelt (Neuer et al. 1985). Das Saatgut wurde im Anschluß in sechs 5 min Waschgängen mit destilliertem Wasser gespült und für 24 Stunden zum Quellen und Keimen in frischem sterilen Wasser stehengelassen.

2.1.3 Oberflächensterilisierung von *Glomus*-Sporen

Die Oberflächensterilisierung von *Glomus*-Sporen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll zur Oberflächensterilisierung von mykorrhizierten Wurzelsegmenten (Gryndler et al., 1997). Die Sporen mit anhaftenden Hyphen wurden fünfmal für 2 min in sterilem 0,1%

$MgSO_4$ x $7H_2O$ gewaschen und anschließend für 4 h bei RT in einer Lösung bestehend aus 0,1% $MgSO_4$ x $7H_2O$, je 5 mg/l Penicillin G (Kaliumsalz, Sigma), Streptomycinsulfat (Calbiochem) und Neomycinsulfat (Sigma) sowie Tetracyclinhydrochlorid (2,5 mg/l) und 50 µl Tween80 (Sigma) inkubiert. Nach 4 min Inkubation in einer 1:50 verdünnten NaOCl-Lösung, die einen Tropfen Tween80 enthielt, wurden die Sporen mindestens zehnmal mit insgesamt 250 ml sterilem H_2O gewaschen. Die Sporen wurden unmittelbar danach zur Keimung in Petrischalen mit M-Medium überführt (siehe Kapitel 2.1.4).

2.1.4 Kultur von AM-Pilzen

2.1.4.1 Duale monoxenische Kultur von AM-Pilzen mit transformierten Karottenwurzeln

Die Verwendung von nicht wachstumslimitierten, transformierten Karottenwurzeln als Wirtsmatrix für AM-Pilze ermöglicht effektives Etablieren und Aufrechterhalten einer dualen axenischen Kultur (Bécard und Fortin, 1988). Die transformierten Karottenwurzeln werden auf MW-(= Modified White´s) Medium (Bécard und Fortin, 1988) bei RT im Dunkeln herangezogen. Zur Etablierung einer dualen Kultur mit *Glomus intraradices* wurden etwa 2 cm lange Wurzelstücke, vorzugsweise mit Wurzelspitze oder Verzweigungen, zusammen mit oberflächensterilisierten Sporen auf ein modifiziertes M-Medium überführt (Karandashov et al., 2000). Die Unterschiede im Vergleich zum von Bécard und Fortin (1988) publizierten M-Medium lagen im Zusatz von 10 mM MES (Sigma) als pufferndem Agens und der Reduktion von Zink- und Mangankonzentration um 50%. Diese Modifikation des Mediums soll eine effektivere Keimung von AM-Sporen ermöglichen. Die Lösungen wurden mit HCl oder NaOH auf die entsprechenden pH-Werte eingestellt (siehe Tabelle1) und 15 min bei 121°C autoklaviert.
Die Kolonisierung der Wurzeln erfolgte nach der Keimung der Sporen auf den M-Medium-Platten. Die Inkubation erfolgte bei RT im Dunkeln.

2.1.4.2 Wachstum von AM-Pilzen ohne Wirt

Oberflächensterilisierte *Glomus*-Sporen wurden in Aggregaten von je etwa 20-50 Sporen mit sterilen Pipettenspitzen in Petrischalen auf M-Medium überführt und bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Vermessung der neugebildeten Sporen erfolgte mit einem Meßokular an einem Mikroskop (Zeiss PM6) bei 125facher Vergrößerung.

2.1.5 AM-Pilz-Inokulumproduktion

Für die Inokulumproduktion bzw. -vermehrung wurde das Blähtonverfahren verwendet. Hierbei sind die Blähtonpartikel aufgrund ihrer porösen Oberfläche in der Lage, besonders viele Chlamydosporen und Pilzmyzel zu binden (Dehne und Backhaus 1986). Um die Gefahr einer Fremdinfektion zu verringern, wurde zur Inokulumvermehrung eine andere Wirtspflanze als die später verwendete Versuchspflanze benutzt (Menge, 1983 und 1986). Zur Inokulumvermehrung wurde *Tagetes* eingesetzt, da diese vom verwendeten *Glomus*-Isolat schnell infiziert wurde und zudem einer Verbreitung von *Pythium* mit dem Inokulum entgegenwirkt (v. Alten et al., 1990). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in nicht sterilen 1,5-l-Plastiktöpfen, die als Substrat 1,1 l Lecaton^{R} (2-4 mm, Porenvolumen 75%; Leca

Deutschland, Halstenbek) und 0,1 l Inokulum enthielten. In jeden Topf wurden drei oberflächensterilisierte Tagetessamen gegeben. Nach einer Wachstumsperiode von zehn bis zwölf Wochen wurde zur Stimulierung der Sporulation der AM-Pilze die Bewässerung der Pflanzen eingestellt und die oberirdischen Pflanzenteile entfernt. Nach weiteren drei bis vier Wochen wurden die Töpfe geerntet. Das Inokulum wurde in Plastiktüten bei Raumtemperatur gelagert, wobei das Material seine Infektiosität über mehrere Jahre hinweg behalten soll (Grunewaldt-Stöcker, 1989).

Tabelle1: Zusammensetzung der verwendeten Medien zur Kultur von AM-Pilzen:

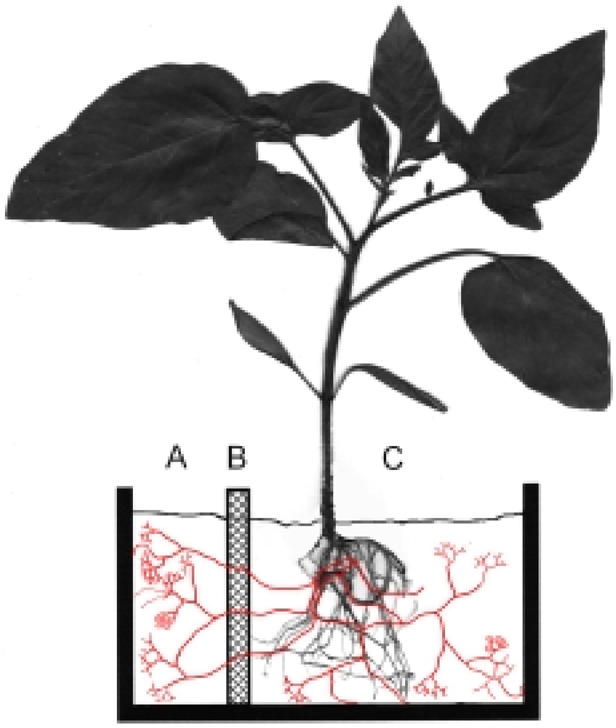
	MW-Medium:[mg/l]	M-Medium: [mg/l]
$MgSO_4$ x $7H_2O$	731	731
Na_2SO_4 x $10H_2O$	**453**	-
KNO_3	80	80
KCl	65	65
NaH_2PO_4	22	-
KH_2PO_4	-	4,8
$Ca(NO_3)_2$ x $4H_2O$	288	288
NaFeEDTA	8	8
KI	0,75	0,75
$MnCl_2$ x $4H_2O$	6	3
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	2,65	1,3
H_3BO_3	1,5	1,5
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0,13	0,065
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0,0024	0,0012
Glycin	3	3
Thiaminhydrochlorid	0,1	0,1
Pyridoxolhydrochlorid	0,1	0,1
Nikotinsäure	0,5	0,5
myo-Inositol	50	50
Saccharose	30000	10000
MES	-	1952
Bacto Agar (Difco)	8000	8000
pH-Wert	5,5	6,5

2.1.6 Kulturbedingungen zur Anzucht der Versuchspflanzen

Die Tomaten wurden im Gewächshaus bei einer Temperatur von 20-35°C und einer relativen Luftfeuchte von etwa 70% angezogen. Als zusätzliche Lichtquellen zum normalen Tageslicht dienten Hochdruck-Quecksilberdampflampen (HPL-N, 400W, Phillipps) und Hochdruck-Metallhalogendampflampen (HPL-T, 400W, Phillipps), die eine Tageslänge von mindestens 12 Stunden gewährleisteten. Bei künstlicher Beleuchtung lag die Lichtintensität 30 cm oberhalb der Töpfe bei etwa 150 $\mu Em^{-2}s^{-1}$. Bei starker Sonneneinstrahlung wurden bis zu 600 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ erreicht.

Sowohl hohe Temperaturen als auch hohe Lichtintensitäten stimulieren die Infektion der Pflanzen mit Mykorrhizapilzen wie auch die Sporenbildung, da vermehrt Photosynthese-Produkte zu den Wurzeln transportiert werden und als Exsudate die Mykorrhizierung regulieren (Hayman, 1974).

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Kompartimentsystems



Legende zu Abbildung 3: Schematische Darstellung des verwendeten Kompartimentsystems zur Isolierung von Myzel von *Glomus intraradices* Sy167 A: Hyphenkompartiment; B: Lochscheibe mit Nylonnetz (30µm Ø); C: Wurzelkompartiment;. Die AM-Pilzstrukturen sind rot markiert dargestellt.

Die in Mykorrhizierungsexperimenten eingesetzten Tomatenpflanzen wurden in einer Lecaton®-Einheitserde-Mischung (siehe Kapitel 2.1.5) entweder in Töpfen oder Kompartiment-Systemen (nach George et al., 1992) herangezogen. Diese Pflanzsysteme, schematisch dargestellt in Abbildung 3, ermöglichen die Isolierung von extraradikalen Sporen und Hyphen arbuskulärer Mykorrhizapilze ohne eine Kontamination durch die Wirtspflanze. Die Kompartiment-Behälter wurden aus 5 mm dicken PVC-Platten gefertigt und besitzen ein Gesamtvolumen von 1500 cm^3. Das Wurzelkompartiment (C) hat ein Volumen von 1000 cm^3 und ist durch eine mehrfach perforierte (Lochdurchmesser 5 mm) 2 mm dicke PVC-Scheibe (B) vom Hyphenkompartiment (A in Abb.3; 500 cm^3 Volumen, gefüllt mit autoklaviertem, gewaschenen Quarzsand, Ø 2-4mm) abgetrennt. Auf beiden Seiten wurde diese Scheibe mit einem 30 µm Nylon-Netz (Hydro-Bios, Kiel) bespannt. Hyphen, nicht jedoch Wurzeln, sind aufgrund ihres Durchmessers in der Lage, das Nylon-Netz zu penetrieren. Darüber hinaus kommt es zur Ausbildung eines luftgefüllten Raumes zwischen den Kompartimenten, der den direkten physikalischen Austausch von Nährstoffen behindert (Hawkins und George, 1999).

Die Töpfe mit den Pflanzen wurden auf Gitterroste gestellt, um Staunässe in den Töpfen zu vermeiden, da diese eine erfolgreiche Mykorrhizierung verhindern kann (Sieverding, 1980; Saif, 1981). Die Pflanzen wurden täglich gegossen und dreimal wöchentlich mit einer 0.5 x Hoagland-Lösung pH 6,0 gedüngt (Hoagland und Arnon, 1939; Eschrich, 1976; Oliver et al. 1983, Burleigh und Harrison, 1999). Die Tomatenpflanzen erhielten einmal wöchentlich Phosphat in Form des leicht verfügbaren KH_2PO_4. Ein höheres Phosphatangebot kann die Mykorrhizierung der Pflanzen stark reduzieren (Daft und Nicolson, 1969; Menge et al., 1978; Ratnayake et al., 1978). Pro Topf und Kompartiment-System wurde daher jeweils 30 ml 0.5 x Hoagland-Lösung (pH 6.0) der in Tabelle 2 beschriebenen Zusammensetzung verabreicht. Bei den Kompartiment-Systemen erfolgte die Düngung ausschließlich in die Hyphen-Kompartimente.

Tabelle 2: Zusammensetzung der 0,5 x Hoagland-Nährlösung

Makroelemente	**Verbindung**	**Konzentration [µM]**
K, N	KNO_3	2500
Ca, N	$Ca(NO_3)_2$ x $4H_2O$	2500
Mg, S	$MgSO_4$ x $7H_2O$	1000
K, P	K_2HPO_4	500*
Mikroelemente		
Cl	KCl	25
B	H_3BO_3	12,5
Mn	$MnSO_4$ x H_2O	2,5
Zn	$ZnSO_4$ x H_2O	1
Cu	$CuSO_4$ x H_2O	0,25
Mo	$(NH_4)_6Mo_7O_{27}$ x H_2O	0,007
Fe	Fe-EDTA	20**

* KH_2PO_4 wurde nur für die phosphathaltige Nährlösung zugegeben; sonst wurden 3000 statt 2500µM KNO_3 eingesetzt.
** Für die Fe-EDTA- Stammlösung wurde 3,72 g Na_2EDTA und 2,78 g $FeSO_4$ x $7H_2O$ bei 80°C in1 l H_2O gelöst.

Tomatenpflanzen, die nicht für Mykorrhizierungsexperimente eingesetzt werden sollten, wurden in 0,4 l Plastiktöpfen herangezogen. Diese waren mit gewaschenem, autoklaviertem Quarzsand (Ø 2-4 mm) gefüllt. Die Töpfe standen dabei in Kunststoffschalen, die mit 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) bis zu einer Höhe von 1 cm gefüllt waren (Daram et al., 1998; Palms et al., 1996; Lauter et al., 1996; Jones, 1982; Tourraine et al. 1997). Die Nährlösung wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Für Experimente mit unterschiedlichen Nährstoffbedingungen wurden die Pflanzen in kleinere Schalen überführt und die entsprechenden Nährlösungen mindestens alle zwei Tage gegen frische Lösungen ausgetauscht.
Zur Herstellung von nahezu N-freier 0,5 x Hoagland- wurden statt $Ca(NO_3)_2$ und KNO_3 gleiche Mengen an $CaCl_2$ und KCl eingesetzt und der pH-Wert mit NaOH auf 6,0 eingestellt. Für die anderen N-Bedingungen wurden $Ca(NO_3)_2$ und KNO_3 durch entsprechende Mengen NH_4Cl oder Glutamin ersetzt.

2.1.7 Ernte der Versuchspflanzen

Die Ernte, der in Mykorrhizierungsexperimenten eingesetzten Versuchspflanzen erfolgte nach 14 bzw. 15 Wochen. Die oberirdischen Pflanzenteile wurden sofort in Flüssigstickstoff eingefroren. Nach gründlicher Säuberung der Wurzeln unter fließendem Wasser wurden diese mittels mehrerer Lagen Zellstoff abgetrocknet. Danach erfolgte die Entnahme von Proben zur Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades. Unmittelbar im Anschluß wurde das restliche Wurzelmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Bei dem zur RNA-Isolierung und für *In situ*-Hybridisierungsexperimente eingesetzten oberirdischen Pflanzenteilen ist folgendes zu beachten:

1. Bei den „jungen Blättern“ handelt es sich um noch nicht voll entfaltete Blätter.
2. Als „Blätter“ werden vollentwickelte Blätter bezeichnet.
3. Bei den verwendeten Blüten handelt es sich um vollständige Blüten mit allen zugehörigen Teilen.
4. Als „junge Früchte“ werden solche bezeichnet, die einen Durchmesser von maximal 1 cm aufweisen.

2.1.7.1 Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades

2.1.7.1.1 Färbung der Wurzeln mit Lactophenolblau

Nach der Säuberung des Wurzelmaterials wurde von jeder Pflanze an verschiedenen Bereichen des Wurzelballens eine Probe entnommen, in Schnappdeckelgläschen überführt und in 5 ml FAA-Fixierlösung (s.u., nach Phillips und Hayman, 1970) fixiert. Bis zur Färbung wurden die Wurzelproben bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Zusammensetzung der FAA-Fixierlösung:

- 45,85% H_2O
- 45,85% (v/v) Ethanol
- 6% (v/v) Formaldehyd
- 2,3% (v/v) Eisessig

Zur eindeutigen Identifizierung von Pilzstrukturen im mikroskopischen Bild erfolgte die Färbung der fixierten Wurzelabschnitte mit Lactophenolblau in Abwandlung der Färbemethoden von Phillips und Hayman (1970) und Kormanik et al. (1980) wie folgt:
Zunächst wurden die Wurzeln zur Aufhellung für 35 min bei 90°C im Heizblock mit 10% KOH inkubiert. Nach mehrfachem gründlichem Spülen mit Leitungswasser wurde das Material für 10 min in 3,7% HCl bei Raumtemperatur angesäuert und anschließend durch 90 min Inkubation in Lactophenolblau (C.I. Nr.47780; 1 g/l; pH 2,3; Merck) angefärbt. Zum Entfärben des Pflanzengewebes wurden die Wurzeln in 50% Lactat überführt und bis zur Bonitierung gelagert.

2.1.7.1.2 Färbung der Wurzeln mit Tinte und Haushaltsessig

Als nichttoxische Alternative zur Färbung der Wurzeln mit Lactophenolblau wurde die von Vierheilig et al. (1998) publizierte Methode verwendet. Hierzu wurden die in FAA-Fixierlösung gelagerten Wurzelproben für 5 min in kochender 10%iger KOH aufgehellt, mehrfach in Leitungswasser gewaschen und anschließend in einer Lösung bestehend aus 5% Tinte (Pelikan, Heidelberg) und 5% Eisessig 5 min gekocht. Die Entfärbung und Lagerung der Wurzeln erfolgte in mit wenigen Tropfen Eisessig angesäuertem Leitungswasser.

2.1.7.2 Mikroskopische Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades

Zur Bonitierung des Verpilzungsgrades wurde die von Schmitz et al. (1991) modifizierte "grid-line-intersect"- Methode nach Ambler und Young (1977) benutzt. Hierzu wurden die mit Lactophenolblau gefärbten Wurzelsegmente auf einem Objektträger ausgelegt und unter dem Mikroskop (Zeiss PM6) bei 125facher Vergrößerung betrachtet. Der so erhaltene Bildausschnitt entspricht einer Länge von 1,4 mm. Jeder innerhalb eines solchen Bildausschnittes sichtbare Wurzelabschnitt wurde auf das Auftreten von Myzel, Arbuskeln und Vesikeln hin überprüft. Dabei gilt ein Segment als mykorrhiziert, wenn mindestens eine der genannten Pilzstrukturen auftritt. Um statistisch abgesicherte Resultate zu erhalten, mußten mindestens 300 Wurzelabschnitte untersucht werden. Der Gesamtmykorrhizierungsgrad ergab sich aus dem prozentualen Verhältnis der als mykorrhiziert eingestuften Wurzelsegmente zur Gesamtmenge der betrachteten Wurzelabschnitte.
Berechnet wurden der arithmetische Mittelwert und der mittlere quadratische Fehler des Mittelwertes.

2.1.8 Isolierung und Reinigung von AM-Sporen und -Hyphen

Als Standardmethode zur Isolierung von AM-Sporen gilt das Aussieben der Sporen aus wäßrigen Bodenaufschlämmungen mit anschließender Saccharose-Dichtegradienten-zentrifugation (Werner, 1987). Das hier angewendete Verfahren entspricht der von Esch et al. (1994) publizierten Methode. Etwa 1 l des mit Pilzmaterial infizierten Substrates wurde in 5 l Wasser aufgenommen. Durch kräftiges Rühren wird das Ablösen von Sporen und anderem organischen Material von den Substratpartikeln erreicht. Das Wasser-Substrat-Gemisch wurde anschließend über eine Siebkombination absteigender Porenweite gegeben (1 mm; 0,5 mm; 0,08 mm; 0,045 mm). Je nach Sporengröße des eingesetzten AM-Isolats wurde die 45 µm- oder 80 µm-Fraktion weiter verwendet. Die so erhaltene Sporenfraktion wurde mit Wasser in eine Petrischale gespült. Durch leichtes kreisförmiges Schütteln wurden die Sporen aufgewirbelt, was zu einer groben Abtrennung von Verunreinigungen wie Wurzel- und Sandpartikeln, aber auch Kleininsekten und Nematoden führt. Die aufgewirbelten Sporen wurden mit einer 20 ml-Spritze abgesaugt, an deren Spitze ein Gummischlauch (Innendurchmesser ca. 2 mm) befestigt war. Etwa 40 ml dieses Wasser-Sporengemisches wurden in großen Glaszentrifugenröhrchen mit gleichem Volumen 70% (w/v) Saccharoselösung unterschichtet und 10 min bei 1400g zentrifugiert (Hettich Rotixa KS). Die sich nun in der Saccharose-Wasser-Grenzschicht befindlichen Sporen wurden mit der o.a. Spritze abgenommen und zur Entfernung der Saccharose auf dem 45 µm-Sieb gründlich gewaschen. Zur weiteren Reinigung der Sporenfraktion wurde diese wiederum in eine Petrischale gespült. Über offener Gasflamme auf 100-200 µm Spitzendurchmesser ausgezogene Pasteurpipetten, die an ihrem oberen Ende mit einem Gummischlauch ver-

sehen wurden, dienten zum Abpipettieren der Sporen, bzw. der noch vorhandenen Verunreinigungen in entsprechende Gefäße.

2.1.8.1 Ernte von Pilzmaterial aus den Kompartimentsystemen

Die im Hyphen-Kompartiment der Kompartiment-Systeme gewachsenen extraradikalen Hyphen und Sporen (Abschnitt 2.1.6) wurden mitsamt umgebendem Quarzsand in 2 l Leitungswasser aufgeschwemmt und im Anschluß über die o.a. Siebkombination gegeben. Die Hyphen und Sporen wurden hierbei in Sieben mit 500 µm und 80 µm Maschenweite angereichert. Die so gewonnenen Fraktionen wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, wo ein Großteil der an den Hyphen und Sporen anhaftenden Partikel durch leichtes Schütteln abgelöst werden konnte. Die so grob gereinigten Hyphen und Sporen wurden mittels leichtem Vakuum auf ein Sieb mit 30 µm Maschenweite gesogen und anschließend durch leichtes Andrücken auf Whatman-Filterpapier angetrocknet. Unmittelbar darauf erfolgte das Einfrieren in flüssigem Stickstoff zur Nukleinsäureextraktion und zur Bestimmung der Nitratreduktaseaktivität.

2.2 Isolierung von Nukleinsäuren

Für die Isolierung von genomischer DNA und RNA aus Pflanzen und Pilzen sind verschiedene Methoden publiziert worden (u.a. Tilburn et al., 1983; Raeder und Broda, 1985; Doyle und Doyle, 1990; Nagy et al., 1988). Die Resultate bezüglich Qualität und Intaktheit der mit diesen Methoden isolierten DNA und RNA waren je nach verwendetem Organismus recht unterschiedlich.

2.2.1 Isolierung genomischer DNA mit CTAB nach Doyle und Doyle

Frisches Myzel von *Glomus intraradices* aus dem Kompartiment-System (0.1g) wie auch Blattmaterial der Versuchspflanzen (0.5 g) wurde in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem N_2 eingefroren und mit wenig Seesand zu einem feinen Pulver gemörsert.
Anschließend wurde das Material in 5 ml 60°C warmen CTAB-Puffer aufgenommen und auf 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt.
Zusammensetzung des CTAB-Puffers:

- 2% (w/v) CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid; Sigma)
- 1,4 M NaCl
- 20 mM EDTA
- 100 mM Tris/HCl pH 8,0
- 0,2% (v/v) β-Mercaptoethanol

Nach 30 min Inkubation bei 60°C und gelegentlichem leichten Schütteln wurde mit gleichem Volumen eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) ausgeschüttelt und 5 min bei 1600g zentrifugiert. Die wäßrige Oberphase wurde abgenommen, zur Fällung der DNA mit 0,7 Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt und nach 20 min Inkubation bei -20°C für 15 min bei 18300g zentrifugiert.

Der Zentrifugationsrückstand wurde mit 70% EtOH gewaschen, etwa 15 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in je 10 µl H_2O pro Reaktionsgefäß resuspendiert. Die so gewonnene DNA wurde für PCR-Experimente verwendet.

2.2.2 Isolierung genomischer DNA nach Raeder und Broda

Das geerntete Pflanzenmaterial wurde mit Flüssigstickstoff in einer vorgekühlten Reibschale zu einem feinen Pulver gemörsert. Je 100 mg des Pulvers wurden mit 1 ml eines 1:1 Gemisches aus Extraktionspuffer und PCI (TE-gesättigtes Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol; 25:24:1) homogenisiert, in Reaktionsgefäße überführt, kurz ausgeschüttelt und 20 min bei 13000g in der auf 4°C gekühlten Laborzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 10 µl/ml RNase-Lösung versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Ausschütteln mit PCI und 10 min Zentrifugation bei 13000g wurde die Oberphase zur selektiven Fällung von hochmolekularer DNA mit 0,6x Vol. eiskaltem 100% Isopropanol versetzt und 15 min bei 18300g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70% EtOH gewaschen, 1 min bei 18300g zentrifugiert, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 100 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 resuspendiert. Die Lagerung dieser für Southern-Analysen eingesetzten DNA erfolgte bei 4°C.

Extraktionspuffer:	200 mM Tris/HCl pH 8,5 250 mM NaCl 25 mM EDTA 0,5% (w/v) SDS 0,2% (v/v) β-Mercaptoethanol
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
RNase-Lösung:	10 mg RNase A (Merck) wurden in 15 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gelöst. Eventuell vorhandene DNasen wurden durch 15 min Inkubation bei 100°C denaturiert.

2.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte leicht modifiziert nach Nagy et al. (1988) in Kombination mit einer von Eggermont et al. (1996) publizierten Methode. Zum Schutz vor einer Kontamination mit RNasen wurden alle zur RNA-Isolierung verwendeten Lösungen mit Ausnahme des Extraktionspuffers mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt (Fedorcsak und Ehrenberg, 1966). Destilliertes Wasser und 8 M Lithiumchlorid wurden für mindestens 1 h unter Rühren mit 0,1% DEPC (v/v) bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert (Sambrook et al., 1989).
Das Pflanzenmaterial wurde unmittelbar nach der Ernte mit Flüssigstickstoff 15 min gemörsert. Zu 100 mg feinem Pulver wurden nun 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 4% SDS, pH 5,0) und 1 ml wassergesättigtes saures PCI (pH 4-4,5)

gegeben, bis zum Auftauen weitergemörsert und auf Reaktionsgefäße verteilt. Nach kurzem Ausschütteln der Proben und 5 min Inkubation auf Eis wurde bei RT und 10000g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in frischen Gefäßen mit gleichem Vol. PCI ausgeschüttelt, 1 min heftig ausgeschüttelt und für 3 min bei 10000g und RT zentrifugiert. Nach erneuter Abnahme der Oberphase, Überführung in frische Reaktionsgefäße und Zugabe des gleichen Vol. CI wurde wieder 1 min kräftig ausgeschüttelt und anschließend bei RT und 10000g 2 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, in frische 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, mit 0,5 x Vol. 8 M $LiCl_{DEPC}$ versetzt und 1 h bei -20°C gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 10000g wurde der Überstand abgegossen, das Präzipitat mit 80% EtOH gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl H_2O_{DEPC} aufgenommen. Das Extinktionsverhältnis bei den Wellenlängen 260/280 (siehe Kapitel 2.2.6) der isolierten RNA lag meistens zwischen 1,7 und 2,0, so daß diese für Northern-Analysen und cDNA-Synthesen eingesetzt werden konnte. Stärker verunreinigte Präparationen wurden nochmals wie oben beschrieben mit PCI ausgeschüttelt, und die Oberphase mit 0,5 Vol. 8 M $LiCl_{DEPC}$ gefällt. Die Ausbeute lag zwischen 100 und 500 µg RNA pro g Frischgewicht.

2.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus AM-Hyphen und Sporen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus isolierten AM-Hyphen und -Sporen wurde das Rneasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Das Funktionsprinzip dieses Kits beruht auf den selektiven Bindungseigenschaften einer auf Silica-Gel basierenden Membran in einem Zentrifugationssäulchen. Pro Präparation konnten maximal 100 mg Pilzmaterial eingesetzt werden. Die größte Ausbeute wurde mit dem mitgelieferten Lysis-Puffer RLC, der Guanidinhydrochlorid enthält, erzielt. Die Ausbeute lag zwischen 10 und 20 µg pro 100 mg Frischgewicht.

Das geerntete Pilzmaterial (maximal 100 mg) wurde in einem vorgekühlten Mörser mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben und zusammen mit dem Stickstoff in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Verdampfen des Stickstoffs wurde die noch gefrorene Probe mit 450 µl RLC-Lysis-Puffer (mit 1% ß-Mercaptoethanol) versetzt und kräftig gemischt. Zur Homogenisierung der Probe wurde diese in ein QIAshredder™-Säulchen überführt und 2 min bei RT und 18300g zentrifugiert. Der Überstand des Eluates wurde mit 0,5 x Vol. EtOH versetzt und in ein RNeasy-Säulchen pipettiert. Nach 15 s Zentrifugation bei 10000g wurde das Säulchen nacheinander mit 700 µl RW1-Puffer und 500 µl RPE-Puffer mit jeweils anschließender Zentrifugation (15 s, 10000g) gewaschen. Nach erneuter Aufgabe von 500 µl RPE-Puffer und 2 min Zentrifugation bei 18300g erfolgte die Elution der RNA durch Aufpipettieren von 30 µl RNase freiem H_2O und 1 min Zentrifugation bei 18300g. Die isolierte RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.2.5 Isolierung von Plasmiden aus transformierten Kulturen von *Escherichia coli*

Das verwendete Protokoll basiert auf der von Birnboim und Doly (1979) publizierten Methode. Das Verfahren ermöglicht in kurzer Zeit die Isolation von Plasmid-DNA in für Restriktionsanalysen und *In vitro*-Transkriptionen erforderlicher Menge und Reinheit. Dazu wurden folgende Lösungen benötigt:

BD1:	50 mM Glukose 10 mM EDTA 25 mM Tris/HCl pH 8,0 4 mg/ml Lysozym
BD2:	0,2 N NaOH 1% (w/v) SDS
BD3:	5 M Kaliumacetat pH 4,8

Übernachtkulturen der Bakterien wurden in 5 ml LB-Medium auf einem Schüttler bei 37°C (Sambrook et al., 1989) angezogen.

Zusammensetzung des LB-Mediums:	10 g/l Bacto Trypton (Difco) 5 g/l Hefeextrakt (Difco) 10 g/l NaCl

Je 1,5 ml der Übernachtkulturen wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 2 min bei 18300g abzentrifugiert. Der Bakterienzentrifugationsrückstand wurde in 100 µl BD1 resuspendiert und zur Lyse 200 µl BD2 hinzugegeben. Die Ansätze wurden gründlich gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl BD3, das die Fällung von genomischer DNA und Proteinen bewirkt, und 5 min Inkubation auf Eis wurde 10 min bei 4°C und 18300g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in einem frischen Eppendorf-Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen PCI ausgeschüttelt und 15 min bei 18300g zentrifugiert. Die Oberphase wurde mit 2,5-fachen Volumen EtOH 10 min bei -20°C gefällt und anschließend 15 min bei 18300g zentrifugiert. Nach Waschen mit 70% EtOH, und Trocknung in der Vakuumzentrifuge wurde die DNA in 50 µl H_2O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.6 Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde durch Messen der Absorption bei 260nm (A_{260}) und 280nm (A_{280}) in Quarzküvetten mit einem Spektralphotometer bestimmt (Lambda 15 UV-VIS Spektrophotometer, Fa. Perkin-Elmer Holding GmbH, München).

DNA und RNA weisen ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm (A_{260}) entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml bei RNA und 20 µg/ml bei einzelsträngigen Oligonukleotiden (Sambrook et al., 1989). Das Verhältnis der Absorptionen A_{260} und A_{280} erlaubt eine Abschätzung der Reinheit der Nukleinsäurepräparation. Reine Nukleinsäurelösungen besitzen Absorptionsquotienten zwischen 1,8 und 2,0 (Sambrook et al., 1989).

2.3 Amplifizierung von DNA-Segmenten durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird die spezifische Amplifikation von DNA-Segmenten ermöglicht, die von spezifischen Oligonukleotidprimern flankiert werden (Saiki et al. 1985). Diese Methode besteht aus drei charakteristischen Phasen: Denaturierung, Primer-Bindung (annealing) und DNA-Polymerisation (elongation). Die automatisierte Wiederholung dieser Schritte in Kombination mit der hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (Saiki et al. 1988) ermöglicht die Polymerasekettenreaktion.

2.3.1 Oligonukleotidprimer

Ein entscheidender Faktor für Erfolg und Spezifität einer PCR sind die Nukleotidsequenzen der zur Amplifikation eines DNA-Segmentes eingesetzten Oligonukleotidprimer. Diese sollten nicht selbstkomplementär oder kombiniert zueinander komplementär sein, da dies in der PCR zu einer verringerten Verfügbarkeit von Oligonukleotidprimern bei der Bindung an die Zielsequenz wie auch zu vermehrt auftretenden unspezifischen Amplifikationsprodukten, den sogenannten Primer-Artefakten oder Primer-Dimeren führen kann.

2.3.1.1 Auswahl geeigneter Sequenzbereiche zur Entwicklung von Oligonukleotidprimern:

Als Datengrundlage zur Auswahl geeigneter Sequenzen zur Herstellung von Oligonukleotidprimern für pflanzliche Nitrattransportergene dienten folgende bei Beginn dieser Arbeit veröffentlichte Sequenzen:

Low-affinity Nitrattransportergene höherer Pflanzen:

LeNRT1;1 (Lauter et al., 1996)	EMBL-Eintrag X92853
LeNRT1;2 (Lauter et al., 1996)	EMBL-Eintrag X92852
AtCHL1(AtNRT1;1) (Tsay et al., 1993)	EMBL-Eintrag L10357

High-affinity Nitrattransportergene höherer Pflanzen

HvNRT2;1 (Trueman et al., 1996)	EMBL-Eintrag U34198
HvNRT2;2 (Trueman et al., 1996)	EMBL-Eintrag U34920
NpNRT2;1 (Quesada et al., 1997)	EMBL-Eintrag Y08210

Aufgrund von Vergleichen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der oben aufgeführten DNA-Sequenzen wurden in den Sequenzen auftretende konservierte Bereiche zur Entwicklung von degenerierten Oligonukleotidprimern verwendet.

Die lyophilisierten Primer (Gibco BRL Custom Primers, Palo Alto, USA) wurden in H_2O resuspendiert, wenn nicht anders vermerkt auf eine Konzentration von 50 pmol DNA pro µl eingestellt und bei -20°C gelagert.

2.3.1.2 Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendete Primer

Tabelle 3:

Liste der verwendeten Primersequenzen in 5´-3´-Richtung

CHL1	ATTTGCGTCCAACATCGTCT	T_m(°C): 47
CHL2	ACAATCATACCGGGACTTCG	T_m(°C): 45
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	T_m(°C): 58
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	T_m(°C): 63
PNT5-6	GGATGCACTCTTCCTGTTACATTTTG	T_m(°C): 51
PNT5-7	GCGTGTACACTTCCAGTAATGTTAGT	T_m(°C): 51
PNT2A	CAAAGTAACGGGGGATAAACCATG	T_m(°C): 51
PNT2B	TATGGTTACTGGGACAAAACATCC	T_m(°C): 49
T17S-1	ATTCCTAGTAAGCGCGAGTCAT	T_m(°C): 49
T17S-2	GTTCACCTACGGAAACCTTGTT	T_m(°C): 48
RACE1	CCACGAGTCGACTCTAGAGCTCGGA TCCTTTTTTTTTTTTTTTTT	T_m(°C): 60
RACE2	CCACGAGTCGACTCTAG	T_m(°C): 44
RACE3	CTCTAGAGCTCGGATCC	T_m(°C): 44
LEMIT1	CTTTAATGGAAGGGTTACGTATG	T_m(°C): 47
LENIT2	CAGGATCACACTCTGTCACTACT	T_m(°C): 50
THAT1	ACTTACTTCGCAGTTCATGCTCGT	T_m(°C): 51
THAT2	GATCGGGATTGATGATCGTCA	T_m(°C): 47
RTHAT1A	ACGAGCATGAACTGCGAAGTAAG	T_m(°C): 50
RTHAT2A	TGACGATCATCAATCCCGATC	T_m(°C): 47
RTHAT1B	ATGAGGAAGTGATTACAAATG	T_m(°C): 41
RTHAT2B	TTCCAGCGTATTGACAAGC	T_m(°C): 44
RLEMIT1	CTTTGGAAATTGCTCATTCGA	T_m(°C): 43
RLENIT1	AGTAGTGACAGAGTGTGATCCTG	T_m(°C): 50

degenerierte Primer:

PFL1	TTGATGATGTACTCTGGYTTRTACCACCA	T_m(°C): 50
PFL2	AAYATGGTGCAGCAGACGGTGGGNTTCAA	T_m(°C): 50
FU3	ACCCGGAACCAAGGGTTGTTCATCATNCC	T_m(°C): 50
FU4	GCAGGCAACAGACGGAAAGANCARAA	T_m(°C): 50
TNIRF2	CAGAARTGTMGNATGATGTGG	T_m(°C): 46
TNIRR1	TTCGGGCANCCNGTCCARTGCAT	T_m(°C): 55
PNT1	ACGTATTTGACGGGAACNATGCAYYT	T_m(°C): 52
PNT2	GCGCAAATTCCMTANCCCCAYTC	T_m(°C): 53
PNT3	TTCGTGTCGTGYCARRAYTGGATG	T_m(°C): 52
PNT4	CATGGATCCCCAYTGNGGRAARTG	T_m(°C): 54

Die Bezeichnung der gemischten Basen erfolgte nach folgender Kodierung:

N = A + C + T + G
R = A + G
Y = C + T
M = A + C

2.3.2 PCR-Reaktionsbedingungen

Für die PCR-Reaktionen wurde ein ”Personal Cycler Version 3.02” (Biometra) mit Heizdeckel verwendet. Ein Überschichten des Reaktionsansatzes mit Mineralöl, um das Verdunsten von Wasser während der Denaturierungsphasen zu verhindern, war daher nicht erforderlich. In 0,5 ml Reaktionsgefäßen wurden folgende Komponenten auf Eis gemischt:

34 µl	H_2O bidest., steril
5 µl	PCR- Thermo-Reaktionspuffer (Promega)
4 µl	25 mM $MgCl_2$ (Promega)
4 µl	dNTP-Mischung; je 10 nmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP (MBI-Fermentas)
1 µl	Primer1, 50 pmol
1 µl	Primer2, 50 pmol
1 µl	DNA als Matrize, ca. 1-50 ng

Die einleitende Denaturierungsphase bei 95°C erfolgte über eine Zeitspanne von 5 Minuten. Nach Zugabe der Taq-Polymerase (2U) bei 90°C folgten 30-45 Zyklen mit einer 30-45 sekündigen Primerbindungsphase bei der entsprechenden Primerbindungstemperatur, einer einminütigen Synthesephase bei 72°C und einer 30sekündigen Denaturierungsphase bei 94°C. Im Anschluß erfolgte eine Endelongation für 10 min bei 72°C. Die Zugabe der Taq-Polymerase bei 90°C (”hot-start”-Verfahren) verhindert eine mögliche Inaktivierung des Enzyms während des ersten Denaturierungsschrittes bei 95°C.

In manchen Fällen wurde über einige Zyklen innerhalb der ersten zehn Zyklen der PCR die Primerbindungstemperatur pro Zyklus um einen bestimmten Temperaturbetrag (in der Regel 1°C/Zyklus) abgesenkt. Diese PCR-Variante, die als „touch-down“ bezeichnet wird, kann auch bei Benutzung von Primern mit stark unterschiedlichen Schmelztemperaturen zu einer effektiven Amplifikation führen. Darüber hinaus wird in einer „touch-down-PCR“ ein größerer Temperaturbereich für die Primerbindung abgedeckt. Dies kann insbesondere bei Verwendung von stark degenerierten Primern zu verbesserten Resultaten beitragen.

2.3.3 Die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die Verwendung des viralen Enzyms Reverse Transkriptase, das in der Lage ist, aus RNA-Molekülen komplementäre DNA-Stränge (cDNA) zu synthetisieren, erlaubt in einer anschließenden PCR-Reaktion die Amplifizierung dieser cDNA. Zum Nachweis, d.h. Amplifizierung einer Ziel-DNA, wird theoretisch nur ein einziges Ausgangsmolekül benötigt, wohingegen zum Nachweis einer mRNA in einer Northern Analyse mindestens 300 fg des Zielmoleküls vorliegen müssen (The DIG Systems User´s Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim). Somit besitzt die RT-PCR eine weit höhere Sensitivität als das Northern-Blot-Verfahren (siehe Kapitel 2.6). Dies ermöglicht in der RT-PCR den Nachweis von mRNA-Molekülen, die nur in bestimmten Zelltypen oder nur zu einem sehr geringen Umfang in Geweben vorhanden sind.

2.3.3.1 Erststrangsynthese

Zur Herstellung von cDNA wurde ein modifiziertes Protokoll, basierend auf dem Handbuch zum „SUPERSCRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis“ (Gibco BRL) verwendet (persönliche Mitteilung, Beate Saal, Köln).
Zunächst wurden die isolierten Gesamt-RNA´s einem DNase-Verdau unterzogen, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Kontamination mit genomischer DNA in der nachfolgenden PCR zu unterbinden. Folgende Komponenten wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen gemischt:

2 µg Gesamt-RNA
5 µl 5x Erststrangpuffer (Gibco)
1 µl DNaseI (Amplification Grade, Gibco)
H_2O_{DEPC} ad 25 µl

Diese Mischung wurde 15 min bei 37°C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 2,5 µl 25 mM EDTA abgestoppt und die RNA durch 10 min Inkubation bei 65°C denaturiert. Nach sofortiger Überführung auf Eis wurden jeweils 13 µl der Ansätze in die Reverse Transkription eingesetzt. Der Einsatz des Primers RACE1 kombiniert die Eigenschaften eines sonst gebräuchlichen Oligo(dT)$_{12-18}$-Primers, der an den polyA-Schwanz eukaryotischer mRNA binden kann und somit die Transkription vom 3´-Ende der mRNA gewährleistet, mit einem Adapter, der die Amplifikation von nichttranslatierten mRNA 3´-Enden (3`-RACE, siehe Kapitel 2.3.3.2) ermöglicht. Die Verwendung eines genspezifischen Primers in der Erststrangsynthese erlaubt eine sehr spezifische Synthese von cDNA aus den Ziel-mRNA-Molekülen. Dies kann in einer verbesserten PCR-Effektivität resultieren.
Auf Eis wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen gemischt:

13 µl DNase-verdaute RNA
1 µl RACE1 (1µg/µl) oder
1 µl genspezifischer Primer (2 µM)
7,5 µl 5 x Erststrangpuffer (Gibco)
10 µl dNTP´s (2,5 mM pro dNTP)
5 µl 0,1 M DTT
1 µl SUPERSCRIPT II™ Reverse Transkriptase (200 U/µl, Gibco)
1 1,5 µl H_2O_{DEPC}

Die Ansätze wurden 1,5 h bei 42°C inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde durch 15 min Erhitzen bei 70°C inaktiviert.
Sollten in der anschließenden PCR Amplifikate von mehr als 1 kb entstehen, so wurden die Ansätze noch mit jeweils 1 µl RNase H (2U/µl, Gibco) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. RNase H ist eine Endoribonuklease, die spezifisch die Phosphodiesterbindungen der RNA in RNA/DNA-Duplex-Molekülen hydrolysiert und somit die Zugänglichkeit von Primern zur cDNA verbessert.
Die cDNA wurde im Anschluß mit dem QIAqiuck PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.6). Der Einsatz der cDNA in die PCR entsprach dem in Kapitel 2.3.1 aufgeführten Protokoll.

2.3.3.2 3´-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die RACE-Methode (Frohman et al., 1988) ermöglicht nach Herstellung von cDNA die Amplifikation von Transkriptbereichen zwischen einem bestimmten Punkt innerhalb eines Transkriptes und seinem 3´- oder 5´-Ende unter Verwendung der PCR.
Die Amplifizierung von 3´-cDNA-Enden setzt eine Erststrangsynthese mit einem OligodT-Adapterprimer (RACE1) voraus. Die Verwendung von genspezifischen Primern in Kombination mit zueinander komplementären Adapterprimern (RACE1, RACE2, RACE3) in aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen ermöglicht dann die selektive Amplifizierung von cDNA-Enden der entsprechenden Zieltranskripte.
Zur Zweitstrangsynthese wurden folgende Komponenten zu einem PCR-Ansatz gemischt:

2 µl cDNA (Erststrang)
1 µl RACE1 (1µg/µl)
1 µl RACE2 (5 pmol/µl)
2 µl genspezifischer Primer1 (GSP1; 50 pmol; bei degeneriertem Primer 100 pmol)
5 µl 10 x PCR- Thermo-Reaktionspuffer (Promega)
4 µl 25 mM $MgCl_2$ (Promega)
4 µl dNTP-Mischung; je 10 nmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP (MBI-Fermentas)
30 µl H_2O

Nach 5 min Denaturierung bei 95°C und Zugabe von 2 U Taq-DNA-Polymerase (Promega) pro Ansatz erfolgte eine Inkubation der Ansätze bei der vorgesehenen Primerbindungstemperatur für 10 min und eine erste Elongationsphase bei 72°C für 30 min (Frohman, 1990), um dann über 35-40 Zyklen einem gewöhnlichen PCR-Reaktionschema zu folgen (siehe Kapitel 2.3.1). Die Primerbindungs- und Elongationszeiten waren allerdings auf 1 min, respektive 2 min ausgedehnt.
Die Produkte einer solchen Zweitstrangsynthese erscheinen auf einem Agarosegel in der Regel als ein Amplifikatschmier von etwa 0-2 kb.
Ein Teil dieses Reaktionsansatzes wurde 1:100 mit H_2O verdünnt und 1µl dieser Verdünnung in eine Standard-PCR-Reaktion (siehe Kapitel 2.3.1) eingesetzt. Unter Verwendung eines stromabwärts von der Bindungsstelle des GSP1 gelegenen GSP2 und RACE3 (Primerbindungstemperatur 48-58°C) erfolgte die Amplifizierung des erwarteten spezifischen Produktes (Drittstrangsynthese).

2.3.4 PCR mit einzelnen Glomus-Sporen und anschließende RFLP-Analyse

Aufgrund ihrer hohen Evolutionsgeschwindigkeit ermöglichen die ITS (internal transcribed spacer)-Regionen der nukleären rRNA die Ausbildung einer möglichen Varianz bis zur Populationsebene (White et al., 1990). Amplifikation dieser DNA- Bereiche mittels PCR und anschließende RFLP-Analyse erlauben somit die Unterscheidung von Spezies anhand molekularer Parameter.

2.3.4.1 Einzelsporen-PCR-Ansätze

Isolierte *Glomus*-Sporen wurden mittels einer an ihrer Spitze ausgezogenen Pasteurpipette auf einer sterilen Petrischale mehrfach in sterilem H_2O gewaschen und anschließend einzeln auf einen mit EtOH gereinigten, sterilen Objektträger überführt. Dort wurden sie mit

einer an ihrer Spitze angeschmolzenen Pasteurpipette zerquetscht, in 4 µl Reaktionsansatz aufgenommen und zum verbliebenen Reaktionsansatz in die 0,5 ml - Reaktionsgefäße pipettiert. Die Reaktionsmischungen wurden mit 30 µl leichtem Mineralöl (Sigma) überschichtet. Dies führt bei dieser speziellen Anwendung erfahrungsgemäß zu reproduzierbar besseren Resultaten (persönl. Mitteilung, Fouad Ouziad, Köln). Die Vorbereitung der Ansätze erfolgte auf Eis, um einer unspezifischen Bindung der Primer oder vorzeitiger DNA-Synthese vorzubeugen. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min bei 95°C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der Matrizen-DNA zu gewährleisten.

2.3.4.2 Verdau von Einzelsporen-PCR-Amplifikaten zur Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP´s)

Je 8 µl eines positiven PCR-Ansatzes wurden mit 1µl Restriktionsenzym sowie 1 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10fach konzentrierten Reaktionspuffers versetzt und 2 h bei der angegebenen Temperatur im Heizblock inkubiert. Nähere Informationen zu den Restriktionsenzymen und Reaktionsbedingungen gibt Tabelle 4.

Im Anschluß wurde je ein Restriktionsansatz mit 2,5 µl Blaumarker (bestehend aus: 0,1% (w/v) Bromphenolblau in 50% (v/v) Glyzerin) gemischt auf ein 2%-Agarosegel aufgetragen.

Tabelle 4: Verwendete Restriktionsendonukleasen, Aktivität und Inkubationsbedingungen

Restriktionsenzyme	U/µl	Inkubations-temperatur [°C]
*Alu*I	8	37
*BsU*RI	10	37
*Hin*fI	10	37
*Hpa*II	10	37
*Taq*I	10	65

Legende zu Tabelle 4: Darstellung der verwendeten Restriktionsenzyme, Aktivitäten der Restriktionsenzyme und Inkubationsbedingungen. Alle Restriktionsenzyme und dazugehörigen Reaktionspuffer wurden von der Firma MBI-Fermentas bezogen.

2.3.5 Analyse der PCR-Produkte

Nach Beendigung der PCR wurden 8 µl der PCR-Ansätze mit 2 µl Blaumarker (bestehend aus: 0,1% (w/v) Bromphenolblau in 50% (v/v) Glyzerin) gegen einen 100 bp Längenstandard (Gibco) auf 1%-Agarosegelen aufgetragen. Nach 40 min Elektrophorese bei 10-14 V/cm wurden mit einer Intas-Geldokumentationsanlage oder mit einer Polaroid-Kamera unter UV-Licht Bilder der Gele erstellt.

2.3.6 Aufreinigung und Gelelution von PCR-Amplifikaten und DNA-Fragmenten

Für die Elution von DNA-Fragmenten und PCR-Amplifikaten aus Agarosegelen wurde ein QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment oder -Produkt wurde möglichst genau mit einem scharfen Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die dem Kit zugrunde liegende Methode beruht nach Aufschmelzen der Agarose auf der Adsorption von DNA-Fragmenten an Glasmilch. Nach Entfernen von unerwünschten Agaroseresten und Salzen durch das mitgelieferte Puffersystem wurde die DNA mit 20 µl H_2O von der Glasmilch eluiert. Hierbei wurde exakt nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Die Aufreinigung von PCR-Amplifikaten, die nur eine sichtbare Produktbande aufwiesen, wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Über eine spezielle Silica-Matrix in einem Zentrifugationsröhrchen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer werden die PCR-Amplifikate von verunreinigenden Salzen, Primer-Artefakten und Oligonukleotidprimern gereinigt. Die Elution der DNA von den Säulchen erfolgte mit 50 µl H_2O oder mitgeliefertem Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5). Die Durchführung richtete sich exakt nach den Vorgaben des Herstellers.

2.4 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Amplifikaten

Die terminale Transferaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase führt zur Addition von einzelnen Deoxyadenosinen an die 3´-Enden der PCR-Amplifikate. Kompatible 3´-T-Überhänge an der Insertionsstelle der verwendeten Klonierungsvektoren pCR™II (Invitrogen) und pGEM®-T Easy (Promega) führen zu einer deutlich verbesserten Ligationseffizienz von PCR-Produkten in diese Vektoren und verhindern gleichzeitig eine mögliche Rezirkularisierung der Plasmide. Der Vektor pCR™II besitzt Gene für eine Ampicillin- und Kanamycinresistenz, wohingegen pGEM®-T Easy nur ein Gen für Ampicillinresistenz aufweist (Abb. 4). Diese Resistenzen ermöglichen eine Selektion der transformierten Klone.

2.4.1 Ansätze zur Ligation von PCR-Amplifikaten in die Klonierungsvektoren pCR™II und pGEM®-T Easy

Ligationen wurden im Falle des Vektors pCR™II mit dem TA Cloning™ System (Invitrogen) und bei pGEM®-T Easy mit dem pGEM®-T Easy Vector System (Promega) den Vorschriften des Herstellers folgend durchgeführt.

Die Ligationsansätze mit dem pGEM®-T Easy Vektor System (Promega) enthielten:

1 µl 10 x T4 DNA-Ligase-Puffer oder
5 µl 2 x Rapid T4 DNA-Ligase Puffer
1 µl pGEM®-T Easy Vektor (50 ng)
1 µl T4 DNA-Ligase (3 Weiss U/µl)
1 µl PCR-Produkt
$H_2O_{bidest.}$, steril, ad 10 µl Gesamtvolumen

Die Ligationsansätze wurden bei Benutzung des 10 x Ligase-Puffers ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Verwendung des 2 x Rapid Ligase-Puffers ermöglichte die Durchführung der Ligationsreaktion innerhalb einer Stunde bei RT.

Ligationsansätze mit pCR™II mit dem TA Cloning™ System (Invitrogen) enthielten:

6 µl $H_2O_{bidest.}$, steril
1 µl 10 x Ligationspuffer
1 µl pCR™II Vektor, 25 ng
1 µl PCR-Produkt
1 µl T4 DNA-Ligase (4 Weiss U/µl)

Die Ligationsansätze wurden ü.N. bei 12°C inkubiert.

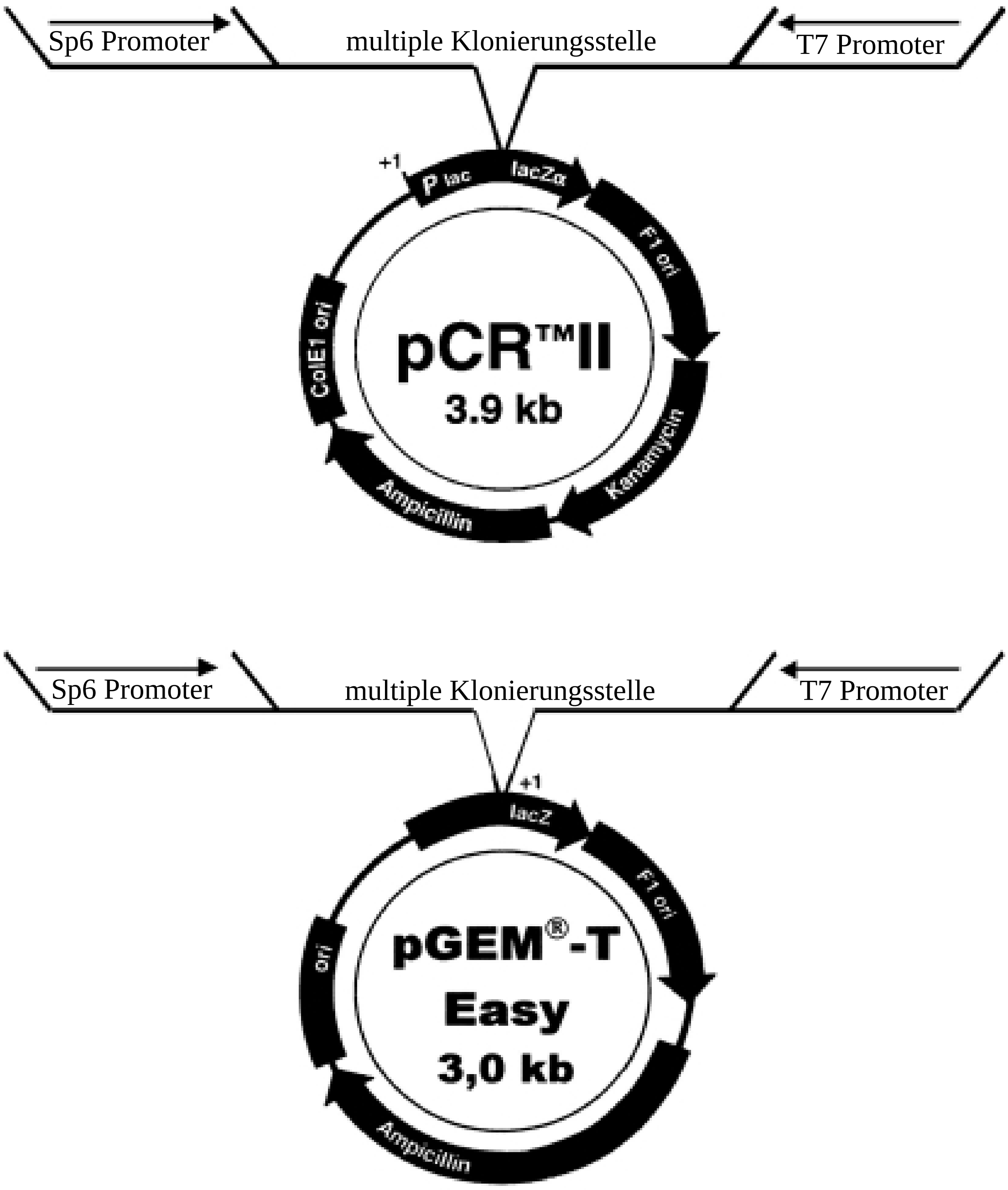
2.4.2 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine modifizierte Anleitung nach Chung und Miller (1993) benutzt. Hierzu wurden 2 ml LB-Medium, das Tetracyclin (50 µg/ml) enthielt, mit *E. coli* XL1-Blue angeimpft und ü.N. unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Mit 400 µl dieser Kultur wurden 40 ml LB-Medium angeimpft und im Schüttler bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,3 angezogen. Nach 5 min Zentrifugation bei 1000g wurden die Bakterien in 4 ml eiskaltem TSS-Puffer aufgenommen und nach 5 min Inkubation auf Eis in Flüssigstickstoff eingefroren. Zur Herstellung von TSS-Puffer (50 ml) wurden 5 g PEG 8000 (Polyethylenglykol, Merck) mit LB-Medium auf etwa 45 ml aufgefüllt, mit 0,75 ml 2 M $MgCl_2$ versetzt und mit HCl auf pH 6,5 eingestellt. Nach Filtration durch einen Sterilfilter (Pall Acrodisc, Ø0,2 µm) wurden der Lösung 2,5 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck) beigefügt und diese mit sterilem LB-Medium auf 50 ml aufgefüllt.
Für die Transformation wurden 100 µl der bei -70°C gelagerten kompetenten *E. coli* -Zellen 5 min auf Eis aufgetaut, mit 2 µl eines Ligationsansatzes versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Durch einen anschließenden Hitzeschock von 1 min bei 42°C wurde die Permeabilität der Bakterienzellwände erhöht. Dies führt zu einer effektiveren Aufnahme der Plasmid-DNA aus dem die Bakterien umgebenden Medium.

2.4.3 Blau-Weiß-Selektion der transformierten Klone

Im *E. coli* Wirtsstamm XL1-blue ist der für die ersten vierzig Aminosäuren der β-Galaktosidase kodierende Teil des *lac*Z-Gens deletiert, d.h. es wird keine funktionsfähige β-Galaktosidase gebildet. Durch Transformation mit einem Plasmid, das diesen Teil des *lac*Z-Gens besitzt, der für das sog. α-Peptid kodiert, kann durch Komplementation eine aktive β-Galaktosidase gebildet werden (Sambrook et al., 1989). Zum Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität wird das künstliche Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-galaktopyranosid (X-Gal) eingesetzt. Dieses wird von der β-Galaktosidase zu intensiv blau gefärbtem 5,5´-Dibrom-4,4´-dichlorindigo umgesetzt. Kolonien, die nach Induktion des *lac*Z-Gens mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosid) blau gefärbt sind, besitzen eine aktive β-Galaktosidase.

Abbildung 4: Karte der verwendeten Klonierungsvektoren



Legende zu Abbildung 4: Karten der verwendeten Plasmide in vereinfachter, modifizierter Darstellung nach den Angaben der Hersteller: PCR™II (3932 bp) mit Ampicillin- und Kanamycinresistenzgen; pGEM®-T Easy (2999 bp) mit Ampicillinresistenzgen
.

Die benutzten Klonierungsvektoren pCR™II und pGEM®-T Easy enthalten den für das α-Peptid der β-Galaktosidase kodierenden Teil des *lac*Z-Gens aus *E. coli*. Innerhalb dieses Sequenzbereiches befindet sich eine multiple Klonierungsstelle (Multiple Cloning Site, MCS), in welche PCR-Produkte ligiert werden können. Wird nun durch Insertion eines

PCR-Produktes das Leseraster des *lac*Z-Gens verschoben, kommt es nicht mehr zur Bildung eines funktionsfähigen α-Peptids der β-Galaktosidase und somit auch nicht mehr zur einer Komplementation. Kolonien, die ein solches Plasmid enthalten, können X-Gal nicht mehr umsetzen und erscheinen daher weiß.

Nach erfolgter Transformation wurden die Bakterien zur Expression der mit der Aufnahme der Plasmide erworbenen Antibiotikaresistenzen mit 900 µl LB-Medium verdünnt und unter Schütteln 1,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 1 min bei 18300g abzentrifugiert und in 100 µl LB-Medium resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden mit 90 µl LB-Medium verdünnt. Jeweils 90 µl der verdünnten und 90 µl der unverdünnten Bakteriensuspension wurden mit einem Drygalski-Spatel auf Selektionsplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert.
Zur Herstellung der Selektionsplatten wurde zu 60°C warmem 1,2% LB-Agar 1/500 Vol. einer Ampicillin-Stammlösung (50 mg/ml) gegeben und je 25 ml dieses LB-Agars schaumfrei in Petrischalen gegossen. Nach Erkalten des Agars wurden 20 µl X-Gal-Lösung (20 mg/ml in Dimethylformamid) und 4 µl IPTG-Lösung (200 mg/ml in H_2O) mit einem Drygalski-Spatel auf den Platten verteilt. Nach 30 min konnten Bakterien auf den so behandelten Platten ausgestrichen werden. Die Lagerung der Antibiotika-, X-Gal- und IPTG-Lösung erfolgte bei -20°C.
Zur Überprüfung der Transformation mußten aus den ü.N. gewachsenen weißen Bakterienkolonien die Plasmide isoliert werden. Mit einer durchgeglühten Impföse wurden Bakterien aus den weißen Kolonien aufgenommen, in Reagenzgläser mit 5 ml LB-Ampicillin-Medium (100 µg/ml Ampicillin) überführt und unter Schütteln bei 37°C ü.N. inkubiert. Die Isolierung der Plasmide ist in Kapitel 2.2.5 beschrieben. 5 µl der isolierten Plasmid DNA-Lösung wurden mit 1 µl des Restriktionsenzyms *Eco*RI (10 U/µl, MBI-Fermentas), 2 µl des zugehörigen 10 x Reaktionspuffers und 0,2µl R Nase-Lösung (siehe Kapitel 2.2.2) in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 37°C 1h inkubiert. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte auf 1%igen Agarosegelen. Die Transformanden konnten anhand der Fragmentgröße identifiziert werden.

2.4.4 Aufbereitung von Plasmid-DNA für die Sequenzierung

Die in der alkalischen Minipräparation gewonnene Plasmid-DNA war vor allem wegen der mitpräparierten RNA, aber auch wegen Phenol- und EtOH-Rückstanden, für den Einsatz in einer Sequenzierungsreaktion nicht rein genug. Daher wurde die DNA mit der entsprechenden Menge RNase-Lösung (siehe Kapitel 2.2.2) 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einer PCI-Extraktion (siehe Kapitel 2.2.2) wurde mit CI (24:1 (v/v) Chloroform /Isoamylalkohol) ausgeschüttelt und 15 min bei 18300g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem 2,5fachen Vol. EtOH und 20 µl 5M K^+-Acetat bei RT gefällt. Nach 30 min Zentrifugation bei RT und 18300g, Waschen mit 70% EtOH und Trocknen in der Vakuumzentrifuge wurde die so aufbereitete DNA in 50 µl H_2O aufgenommen.

2.4.5 Sequenzierung der klonierten DNA-Segmente

Zur automatischen Sequenzanalyse der klonierten PCR-Amplifikate wurde ein ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer unter Verwendung des ABI PRISM™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (beides PE-Biosystems, Weiterstadt) eingesetzt. Die

Sequenzierungsreaktion erfolgte von doppelsträngiger Plasmid-DNA ausgehend nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTP). Die DNA-Synthese wird in nur einer alle vier unterschiedlich markierten Didesoxynukleotide enthaltenden PCR-Reaktion durchgeführt. Die Sequenzdetektion erfolgt im Genetic Analyzer bei der Auftrennung der Proben in einer Matrixkapillare durch Laser-angeregte Fluoreszenz.

Der Sequenzierungsansatz enthielt in 10 µl:

4 µl Premix (Puffer, dNTP-Mix, ddNTP-Mix, Taq-DNA-Polymerase)
1 µg dsDNA (Präparation siehe Kapitel 2.2.5)
5 pmol Primer

Folgende Primer wurden für die Sequenzierungsansätze benutzt:

pUC/M13 forward	GTTTTCCCAGTCACGAC
pUC/M13reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
T7-Primer	TAATACGACTCACTATAGGG

Dieser Ansatz wurde für eine PCR-Reaktion im Personal Cycler (Biometra) mit folgenden Parametern eingesetzt:

96°C	30 s	Denaturierung	30 Zyklen
50°C	15 s	Annealing	
60°C	4 min	Elongation	

Nach Beendigung der Sequenzreaktion wurde die DNA zur Abtrennung von nicht eingebauten Nukleotiden durch Zugabe von 10 µl H_2O, 2 µl 3M Natriumacetat pH 5,0 und 55 µl EtOH gefällt und bei RT 30min bei 18300g abzentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und die DNA mit 200 µl 70% EtOH gewaschen, 5 min bei 18300g zentrifugiert und nach erneutem Entfernen des Überstandes in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 25 µl Terminationspuffer (TSR-Puffer, Perkin Elmer) aufgenommen. Die Probe wurde sofort zur Sequenzierung eingesetzt oder bei 4°C gelagert. Die so vorbereitete Probe wurde in spezielle Mikroreaktionsgefäße (Perkin Elmer) überführt und mit Septen verschlossen. Nach 2 min Denaturierung bei 95°C wurden die Proben in den Genetic Analyzer überführt und das Sequenzierungsprogramm gestartet.

2.5 Herstellung markierter DNA- und RNA-Sonden für Hybridisierungs-Experimente

2.5.1 Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin durch PCR

Zur Hybridisierung der Southern-Blot-Filter wurden mit Digoxigenin markierte DNA-Sonden eingesetzt. Die Taq-DNA-Polymerase kann während einer PCR-Reaktion mit hoher Effizienz Digoxigenin-11-dUTP in PCR-Produkte einbauen, die dann als Gensonden eingesetzt werden können. Die Herstellung der Dig-markierten Sonden erfolgte unter Verwendung des PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) nach den Angaben des Herstellers. Isolierte Plasmid-DNA wurde in einer Konzentration von etwa 1-10 ng/µl DNA als Matrize eingesetzt. Die verwendete PCR-Methode war dabei abhängig von den Bindungstemperaturen der verwendeten Primer und von der Länge des erwarteten PCR-Produktes. Der Einbau des Digoxigenin-11-dUTP konnte durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden. Mehrfacher Einbau von Digoxigenin-11-dUTP führt zu einer Erhöhung des Molekulargewichts des PCR-Produkts und damit zu einer Retardation des Laufverhaltens in einer Gelelektrophorese gegenüber einem PCR-Ansatz ohne Digoxigenin-11-dUTP. Die Lagerung der mit Digoxigenin markierten PCR-Produkte erfolgte bei -20°C.

2.5.2 Herstellung von RNA-Sonden durch *In vitro*-Transkription

Zur Herstellung von RNA-Sonden war zunächst die Linearisierung der Plasmide mit den klonierten Gensonden durch Schneiden mit Restriktionsenzymen erforderlich. Die nun nicht mehr zirkulären Vektoren wurden dann als Matrize in eine *In vitro*-Transkriptionsreaktion eingesetzt. Die benutzten Klonierungsvektoren pCR™II (Invitrogen) und pGEM®-T Easy (Promega) besitzen in entgegengesetzter Orientierung Promotoren für die Sp6- und die T7-RNA-Polymerase (Abb. 4). Somit konnten Sense- und Antisense-RNA vom selben Vektor transkribiert werden.
Die Hybridisierung der Northern- und RNA-Dot-Blot-Filter erfolgte mit Digoxigenin markierten RNA-Sonden, die dann immunologisch mit Chemilumineszenz- und kolorimetrischem Verfahren (Roche) nachgewiesen wurden. Bei den *In situ*-Hybridisierungen wurden ^{35}S-markierte RNA-Sonden eingesetzt, da diese bei mikroautoradiographischem Nachweis eine höhere Sensitivität gewährleisten als vergleichbare mit Digoxigenin markierte RNA-Sonden (Schmelzer E., pers. Mitteilung).

2.5.2.1 Linearisierung der als Matrize eingesetzten Plasmide

In einem Endvolumen von 200 µl wurden 30 µg der isolierten Plasmid-DNA mit 2 µl RNase Lösung (siehe Abschnitt 2.2.2), 5 µl des benötigten Restriktionsenzyms (BcUI, 5U/µl und NcoI, 10U/µl, MBI-Fermentas) und mit 20 µl des zugehörigen 10fach konzentrierten Restriktionspuffers 2 h bei 37°C und zur Inaktivierung des Enzyms weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden mit gleichem Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; = PCI) ausgeschüttelt und 15 min bei 18300g zentrifugiert. Die Oberphase wurde abgenommen, mit 2,5 Vol. 100% EtOH und 0,05 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 30 min bei -20°C gefällt und 20 min bei 18300g abzentrifugiert. Die DNA wurde mit 70% EtOH gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20

µl H_2O aufgenommen. Die Endkonzentration des linearisierten Plasmids lag bei etwa 1 µg/µl.

2.5.2.2 Herstellung von mit Digoxigenin markierten RNA-Sonden

Zur *In vitro*-Transkription wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge zu einem Gesamtvolumen von 20µl gemischt:

1 µg linearisierte Matrizen-DNA (variables Volumen)
2 µl rNTP´s (je 10 mM ATP, CTP, GTP; 6,5 mM UTP, 3,5 mM Dig-11-dUTP)
2 µl 10 x Transkriptionspuffer (Roche)
1 µl RNaseOUT™ (40 U/µl, Gibco)
ad 18 µl mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltes H_2O
2 µl RNA-Polymerase (Sp6 oder T7, 10U/µl Roche)

Die Ansätze wurden kurz abzentrifugiert und 3 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl DNaseI (Amplification Grade, 1U/µl, Gibco) und 15 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA pH 8,0 gestoppt. Die Lagerung der Ansätze erfolgte bei -70°C. Die mit Digoxigenin markierten Sonden waren so über ein Jahr lang verwendbar.

2.5.2.3 Herstellung radioaktiv markierter RNA-Sonden

Zur *In vitro*-Transkription wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge zu einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt:

1 µg linearisierte Matrizen-DNA (variables Volumen)
3 µl rNTP´s (je 10 mM ATP, CTP, GTP)
2 µl 10 x Transkriptionspuffer (Roche)
1 µl 0,75 M DTT
1 µl RNAsin (40 U/µl, Promega)
ad 18 µl mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltes H_2O
1 µl RNA-Polymerase (Sp6 oder T7, 10 U/µl, Roche)
5 µl ^{35}S-UTP (50 µCi, 400 Ci/mmol)

Die Ansätze wurden gemischt, kurz abzentrifugiert und 35 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 µl DNaseI (Roche) und weiteren 15 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 0.5 M EDTA gestoppt. Zu Trennung der Transkripte von den nicht eingebauten Nukleotiden wurden die Ansätze mit 65 µl TE versetzt und über Sephadex G25-Säulen gereinigt (Sambrook et al., 1989). Hierzu wurden 1 ml-Spritzen unter Wasserstrahlvakuum mit vorgequollenem Sephadex G25 gefüllt, mit TE_{DEPC} äquilibriert und 3 min bei 1600g zentrifugiert. Die Transkriptionsansätze wurden auf die Säulen gegeben und ebenfalls 3 min bei 1600g zentrifugiert. Die Eluate wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Je 1 µl des Transkripteluates wurde mit 4 ml Szintillationscocktail (Rotiszint 22, Roth) versetzt und die Aktivität der Probe mit einem Beckman LS 1800-Szintillationszähler gemessen. Die Einbauraten lagen in verschiedenen Ansätzen zwischen 20 und 90%

2.5.2.4 Größenbestimmung und partielle Hydrolyse der Transkripte

Zur Kontrolle der Transkriptgröße wurden 2 µl der mit Digoxigenin und 5 µl der gereinigten radioaktiv markierten Transkripte zusammen mit einem RNA-Längenstandard (Promega, 0,28-6,58 kb) auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillar- oder Vakuum-Blot auf Hybond-N-Membran (Amersham) oder Biodyne B-Membran (Pall) transferiert. (siehe Kapitel 2.6.4.2)

Zur Größenbestimmung der mit Digoxigenin markierten Transkripte wurden die Membranen nach dem Protokoll des Roche Chemilumineszenz-Detektionssystems behandelt (siehe Kapitel 2.6.5). Die Filter mit den radioaktiv markierten Transkripten wurden 3 h bei RT mit Kodak X-AR 5-Röntgenfilm belegt, der wie in Kapitel 2.6.6 beschrieben entwickelt wurde.
Die radioaktiv markierten Transkripte wurden anschließend partiell hydrolysiert, um die für die *In situ*-Hybridisierung optimalen Transkriptgrößen von 150-200 bp zu erzielen. Die notwendigen Hydrolysezeiten wurden gemäß folgender Formel berechnet:

Hydrolysezeit (min) = L_A-L_E / 0,11 (bp/min) x L_A x L_E

L_A = Ausgangslänge der Transkripte (in kb)
L_E = Endlänge der Fragmente

Die markierten Transkripte wurden mit dem gleichen Vol. Hydrolysepuffer (80 mM $NaHCO_3$, 120 mM Na_2CO_3, pH 10,2; Somssich et al., 1988) versetzt und für die berechnete Zeit bei 60°C inkubiert. Die Hydrolyse wurde anschließend auf Eis gestoppt und die RNA-Fragmente pro 200 µl Hydrolysat durch Zugabe von je 6,75 µl 3 M Natriumacetat pH 6,0, 1 µl 1 M Essigsäure, 550 µl EtOH und 6µl hitzedenaturierter Heringssperma-DNA (10 mg/ml) 30 min bei -20°C gefällt. Nach 30 min Zentrifugation bei 18300g und Trocknung an der Luft wurden die Präzipitate in 30 µl TE aufgenommen. Nach erneuter Bestimmung der Probenaktivität (siehe Kapitel 2.5.3) konnten die Proben mit 1x TE auf eine RNA-Konzentration von 1 ng/µl eingestellt werden.
Die ^{35}S-markierten RNA-Sonden wurden bei -80°C gelagert und waren über etwa drei Monate verwendbar.

2.6 Hybridisierung von DNA und RNA mit Dig-markierten Gensonden

2.6.1 Verdauung genomischer DNA mit Restriktionsenzymen

Für Southern-Analysen wurden 20 µg genomische DNA aus Tomate mit 10 U Restriktionsenzym/µg DNA unter Verwendung der vom Hersteller (Promega) mitgelieferten Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 500 µl geschnitten. Die Restriktionsansätze wurden 6 h bei 37°C und zur Inaktivierung des Enzyms 10 min bei 65°C inkubiert.

2.6.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe erfolgte mit einer horizontalen Agarose-Gelelektrophorese. Die verwendeten Gele hatten Konzentrationen von 0,8 bis 2% Agarose in TAE-Puffer (= 40 mM Tris, 1 mM EDTA; die 50fache Stammlösung wurde mit Eisessig auf pH 8 eingestellt). Zugabe von 0,5 µg EtBr pro ml Gel ermöglichte eine deutlich verbesserte Darstellung der DNA-Fragmente unter UV-Licht. Die Proben wurden zum Auftragen mit 0.2 x Vol eines Blaumarkers (bestehend aus: 0,1% (w/v) Bromphenolblau in 50% (v/v) Glyzerin) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 10-14 V/cm über einen Zeitraum von 20-120 min gegen einen 100 bp oder 1 kb Längenstandard (Gibco). Die Dokumentation der Gele erfolgte unter UV-Licht mit einer Geldokumentationsanlage der Firma Intas oder mit einer Polaroid-Sofortbildkamera.

2.6.3 Auftrennung von RNA auf denaturierenden Agarosegelen

Die Auftrennung isolierter RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit formaldehydhaltigen Agarosegelen (Sambrook et al., 1989). Folgende Lösungen wurden dazu benötigt:

- Northern-Puffer (10 x konzentriert): 200 mM MOPS (Sigma), 50 mM Natriumacetat und 10 mM EDTA in H_2O; der pH des Puffers wurde mit 10 M NaOH auf 7,0 eingestellt. Der Puffer wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.
- Probenpuffer (2 x konzentriert): 500 µl deionisiertes Formamid wurden mit 190 µl 37% Formaldehydlösung und 100 µl 10 x Northern-Puffer gemischt.
- Blaumarker (10 x konzentriert): 0,1% Bromphenolblau und 175 µg/ml EtBr in 50% Glyzerin

Die denaturierenden Agarosegele enthielten 1,2% Agarose (Gibco BRL) und 7% Formaldehyd in 1 x Northern-Puffer. Für 50 ml Gel wurden 0,6 g Agarose in 35 ml H_2O und 5 ml 10 x Northern-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf 60°C wurden 10 ml 37% Formaldehyd zugesetzt. Dann konnte das Gel in ein entsprechendes Gelbett gegossen werden.
Die RNA-Proben wurden mit gleichem Vol. Probenpuffer und 0,1Vol. Blaumarker versetzt, 10 min bei 65°C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und auf die Gele aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1 x Northern-Puffer bei 2-5 V/cm über einen Zeitraum von 60-120 min.

2.6.4 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Zur Übertragung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen (Biodyne B, Pall; HybondN, Amersham) wurde ein 2016 VacuGeneXL Vakuum Blotting System (Pharmacia LKB) eingesetzt. Dieses System erlaubt durch die Erzeugung eines Niedrigdruckvakuums die Übertragung von Nukleinsäuren auf eine Transfermembran. Die Gele müssen während des Transfers ständig mit Transferpuffer bedeckt sein, um einen gleichmäßigen und schnellen Transfer zu gewährleisten. Die Transferzeit beträgt hierbei für RNA etwa 4 h und für hochmolekulare DNA nur etwa 1 h. Dies bedeutet gegenüber dem Kapillarblotverfahren von Southern (1975) einen deutlichen Zeitvorteil.

2.6.4.1 Transfer von DNA auf Nylonmembran (Southern-Transfer)

Zum Transfer von PCR-Amplifikaten und Plasmid-Restriktionsfragmenten wurde ohne weitere Vorbehandlung der Gele 0,4 N NaOH als Transferpuffer eingesetzt. Nach etwa 20 min bei 50 mbar Vakuum war der Transfer abgeschlossen. Die Membran (Biodyne B, Pall) wurde kurz in 2 x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat, pH 7,0) gewaschen, getrocknet und zur irreversiblen Bindung 5 min mit UV-Licht bestrahlt.
Der Transfer von verdauter genomischer Tomaten-DNA wurde hingegen nach einem modifizierten Protokoll der Firma Pall durchgeführt. Dieses Protokoll unterscheidet sich vom klassischen Southern-Transfer-Verfahren (Sambrook et al., 1989) dadurch, daß das Gel nach der Denaturierung mit einer stark basischen, NaCl-haltigen Lösung nicht neutralisiert wird. Dies bedeutet, daß die ersten Schritte des Transfers bei alkalischem pH stattfinden. Die Anhaftung von DNA an die Membran wird somit gefördert.
Nachdem das Gel luftblasenfrei auf die mit 20 x SSC befeuchtete Membran (Biodyne B, Pall) aufgebracht wurde, konnte leichtes Vakuum (40 mbar) angelegt werden. Unmittelbar darauf wurde für 4 min 50 ml Depurinierungslösung (0,25 M HCl) auf das Gel gegeben und sofort wieder entfernt. Nachdem 50 ml Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) das Gel für 3 min bedeckt hatten wurde die Transferkammer mit Transferpuffer (20 x SSC) soweit aufgefüllt, daß das Gel vollständig bedeckt war. Der Transfer dauerte in der Regel nicht länger als 60 min. Die Membran wurde bei RT getrocknet und im Anschluß zur Immobilisierung der DNA 30 min bei 80°C gebacken.

2.6.4.2 Übertragung von RNA auf Nylonmembran (Northern-Transfer)

Der Transfer von mit denaturierenden Agarosegelen aufgetrennter RNA auf Nylonmembran (Biodyne B, Pall oder Hybond N, Amersham) erfolgte ohne weitere Vorbehandlung des Gels mit 10 x SSC. Die Membran wurde luftblasenfrei auf die mit 20 x SSC angefeuchtete Membran aufgebracht und ein Vakuum von 60 mbar angelegt. Je nach Dicke des Gels dauerte der Transfer zwischen 1 und 4h. Die Membran wurde bei RT getrocknet und 5 min zur Fixierung der RNA an den Filter mit UV-Licht bestrahlt.

2.6.4.2.1 Vakuum-RNA-Dot-Blotting

Dot- und Slot-Blotting sind schnelle und effektive Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse von Nukleinsäuren. Die direkte Auftragung von DNA und RNA auf Transfermembran wird beim Vakuum-Dot-Blotting durch Anlegen eines leichten Vakuums unterstützt, das die Nutzung von räumlich definierten Auftragungspunkten auf der Membran ermöglicht. Die verwendete Dot-Blotting-Anlage erlaubt die gleichzeitige Auftragung von 144 Proben auf eine Membranfläche von etwa $7mm^2$ pro Probe. Dabei wurde nach einem Protokoll von Sambrook et al. (1989) verfahren.
Die Transfermembran (Biodyne B, Pall) wurde in 20 x SSC angefeuchtet und luftblasenfrei auf ein in der Dot-Blotting-Apparatur befindliches, ebenfalls mit 20 x SSC befeuchtetes Whatman-Papier (Chromatography Paper 3MM, Whatman) gelegt. Anschließend wurde die Dot-Blotting-Apparatur vollständig zusammengesetzt, alle Probenauftragungsmulden mit 500 µl 10 x SSC gefüllt und dieses durch Anlegen eines leichten Vakuums (Vakuum Pumpe 2016-012, Pharmacia LKB) durch die Membran gesogen. Die in H_2O_{DEPC} aufgenommenen RNA-Proben wurden mit dem dreifachen Vol. Aufnahmepuffer (Formamid, Formaldehyd [37%], 20 x SSC; 20:7:2) gemischt, 15 min bei 68°C denaturiert und sofort auf Eis gesetzt.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 x Vol. 20 x SSC und das Beladen des Filters mit den RNA-Proben über die Auftragungsmulden. Nach Anlegen eines leichten Vakuums und Passieren der Proben wurde die Membran an jedem Auftragungspunkt mit 1 ml 10 x SSC gewaschen. Anschließend wurde noch weitere 5 min Vakuum gezogen, um die Membran leicht anzutrocknen. Die Membran wurde aus der Dot-Blotting-Apparatur entnommen und für 5 min mit UV-Licht bestrahlt, um eine irreversible Bindung der RNA sicherzustellen. Bis zur Hybridisierung konnten die Membranen einige Tage gelagert werden.

2.6.5 Hybridisierung der Filter mit Dig-markierten DNA- oder RNA-Sonden

Hybridisierungen mit Dig-markierten Sonden und der Nachweis der entstandenen Hybride wurden nach Protokollen des "The DIG System User´s Guide for Filter Hybridization" (1995) der Firma Boehringer (seit 1999: Roche) durchgeführt.
Zur Herstellung des Vorhybridisierungs- und Hybridisierungspuffers wurden DIG Easy Hyb Granules (Roche) in der vorgesehenen Menge H_2O_{DEPC} bei 37°C gelöst. Zur Vorhybridisierung wurden die Filter mit 20 ml DIG Easy Hyb (Roche)/100 cm^2 Membranfläche in Polyethylenfolie eingeschweißt und im Schüttelwasserbad bei der vorgesehenen Hybridisierungstemperatur inkubiert. Nach 2 h Vorhybridisierung wurde der Vohybridisierungspuffer entfernt und die Membran in gleicher Weise ü.N. in mindestens 3 ml Hybridisierungspuffer pro 100 cm^2 Membranfläche hybridisiert. Der Hybridisierungspuffer enthielt zusätzlich ca. 20 ng/ml der mit Digoxigenin markierten DNA-Sonde oder ca. 100 ng/ml der mit Digoxigenin markierten RNA-Sonde. Die Vorhybridisierungs- und Hybridisierungstemperaturen lagen für DNA-DNA-Hybridisierungen bei 42°C und für RNA-RNA-Hybridisierungen bei 68°C. Die Dig-markierten Sonden wurden vor Zugabe zum Hybridisierungspuffer in je 50 µl H_2O für 10 min bei 95°C denaturiert.

2.6.6 Waschen der Filter und Nachweis der mit Digoxigenin markierten Sonden

Zum immunologischen Nachweis der hybridisierten Sonden wurde ein Konjugat aus polyklonalen Schaf-anti-Digoxigenin-Antikörpern und alkalischer Phosphatase eingesetzt. Nach Bindung dieses Antikörperkonjugates an die hybridisierte Sonde erfolgte der Nachweis der Signale durch Zugabe von kolorimetrischen oder Chemilumineszenz-Substraten der alkalischen Phosphatase. Die Benutzung eines kolorimetrischen Substrates führt zur Bildung eines Signales (Farbniederschlag) direkt auf der Membranoberfläche, wohingegen für den Nachweis eines Chemilumineszenz-Signales die Verwendung von Röntgenfilm bzw. elektronischer Detektionssysteme (z.B. LumiImager, Roche) notwendig ist.

Überschüssige DNA-Sonden, die nicht durch Hybridisierung an die Membran gebunden waren, wurden zunächst 2 x 5min bei RT mit einem Puffer bestehend aus 2 x SSC und 0,1% SDS und anschließend 2 x 15min bei 68°C mit 0,5 x SSC/0,1% SDS abgewaschen, wobei 50 ml Puffer pro 100 cm^2 Membran eingesetzt wurden. Bei RNA-Sonden wurde bis auf eine Verlängerung der Inkubationszeit bei RT (2 x 15min) wie o.a. verfahren.
Die weiteren Arbeitsschritte bis zur Zugabe der Substrate der alkalischen Phosphatase wurden unter leichtem Schütteln bei RT durchgeführt.

Für den Nachweis wurden folgende Puffer und Lösungen benötigt:

Puffer 1:	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5, eingestellt mit $NaOH_{konz.}$
Puffer 2:	1% (w/v) Blockierungsreagens in Puffer 1
Puffer 3:	100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5
Waschpuffer:	Puffer 1 mit 0,3% (v/v) Tween20 (Sigma)
Antikörperlösung:	Anti-Dig-AP-Konjugat/Fab-Fragmente (Roche), Kolorimetrischer Nachweis: 1:5000 (150 mU/ml) in Puffer 2 Chemilumineszenznachweis: 1:10000 (75 mU/ml) in Puffer 2
NBT-Lösung:	75 mg/ml NBT (= Nitroblau-Tetrazoliumsalz), gelöst in 70% Dimethylformamid
BCIP-Lösung:	50 mg/ml BCIP (=5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat), gelöst in 100% Dimethylformamid
CSPD®-Lösung:	1:100 in Puffer 3 verdünnte 25 mM CSPD®(= Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2`-(5`-chloro)tricyclo [$3.3.1.1^{3,7}$]decan}-4-yl) phenylphosphat) -Stammlösung (Roche)

Die Membranen wurden 1 min in Waschpuffer, 30 min in 50 ml/100 cm^2 Puffer 2 und anschließend 30 min in Antikörperlösung inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden in zwei Waschschritten von je 15 min in 100 ml/100 cm^2 Waschpuffer entfernt. Nach 2 min in Puffer 3 erfolgte die Zugabe der Substratlösungen. Für den kolorimetrischen Nachweis wurden die Filter nun mit 10 ml/100 cm^2 einer Färbelösung bestehend aus 45 µl NBT-Lösung und 35 µl BCIP-Lösung in Puffer 3 in eine Polyethylenfolie eingeschweißt und im Dunkeln bei RT inkubiert. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung von NBT. Durch Anwesenheit von BCIP kommt es zur Bildung eines braunvioletten Niederschlages. Die Dauer der Färbereaktion war abhängig von der Signalintensität und betrug zwischen 5 min und 16 h. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Filter in sterilem 1 x TE gewaschen und an der Luft getrocknet. Beim Chemilumineszenz Nachweis mit CSPD® wurden die Filter nach Äquilibrierung in Puffer 3 für 5 min in 5 ml/100 cm^2 CSPD®-Lösung inkubiert. Die Membranen wurden feucht zwischen zwei Polyethylenfolien gelegt und die überschüssige Substratlösung durch Überstreichen mit einem Tuch entfernt. Nach dem Einschweißen der Membranen in die Kunststoff-Folie und 15 min Inkubation bei 37°C wurden die Filter mit Lumi-Film (Roche) oder Hyperfilm™ ECL™ (Amersham) belegt. Die Auflagezeiten betrugen 2 min bis 48 h. Die Entwicklung der Filme erfolgte durch 5 min Inkubation in Eukobrom-Entwickler (Tetenal) und weitere 5 min in Superfix-Fixierer (Tetenal). Nach gründlichem Wässern wurden die Filme getrocknet und bei RT gelagert.

2.6.7 Quantifizierung von Hybridisierungssignalen

Bilder der erstellten gefärbten Filter und Röntgenfilme wurden mit der Intas-Geldokumentationsanlage oder einem Flachbettscanner (MD 9850, Medion) digitalisiert und gespeichert. Die Auswertung der Signale erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms NIH Image 1.61 („Public-domain"-Programm von W. Rasband, U.S. National Institute of Health, Bethesda, USA). Durch Bestimmen der Farbintensitäten einzelner Hybridisierungssignale (Banden, Dots) und Subtraktion der Farbintensitäten gleich großer

Flächen unmittelbar ober- und unterhalb des Signals konnte die Signalstäke in relativen Einheiten angegeben werden.

2.6.8 Entfernen der mit Digoxigenin markierten RNA-Sonden

Zunächst wurde durch kurzes Waschen mit sterilem H_2O das Chemilumineszenzsignal entfernt. Das Ablösen der hybridisierten Sonde wurde durch Übergießen mit kochender 0,1% SDS-Lösung und anschließender 10 min Inkubation unter heftigem Schütteln erreicht. Nach 5 min Inkubation in 2 x SSC/0,1% SDS konnte erneut mit der Vorhybridisierung begonnen werden.

2.7 *In situ*-RNA-Hybridisierungen

2.7.1 Fixierung und Einbettung des verwendeten Pflanzen- und Pilzmaterials

Zur Fixierung von pflanzlichen Geweben können unterschiedliche Fixative eingesetzt werden. Aldehyde eignen sich hierfür ganz besonders. Während Paraformaldehyd zur Fixierung von jungen, weichen Geweben benutzt wird, ist Glutaraldehyd zur Fixierung älterer Gewebe mit großen Vakuolen, dicken Zellwänden und mit ausgedehntem Interzellularraum besonders gut geeignet. (Schmelzer et al , 1989). Zur Fixierung von Teilen mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Tomatenpflanzen wurde daher Glutaraldehyd als Fixativ verwendet.

2.7.2 Fixierung von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln mit Glutaraldehyd

Zur Fixierung wurden 0,3 bis 1 cm lange Wurzelabschnitte und etwa 0,3 x 0,3 cm große Stücke der Tomatenblätter sowie ganze Blüten und Früchte mit einem Fixativ aus 1% Glutaraldehyd in 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 (Schmelzer et al. 1989) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Um eine optimale Infiltration des Fixativs in das Probenmaterial zu gewährleisten, wurden die Probengefäße mehrfach für je 2 min evakuiert und sofort wieder belüftet, bis die Wurzelstücke auf den Boden der Probengefäße sanken.
Nach 1 h Inkubation auf Eis wurde das Probenmaterial kurz in 20 ml eiskaltem Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen, bevor mit der Entwässerung und Einbettung des Wurzelmaterials begonnen wurde.

2.7.3 Einbettung in Fibrowax

Zur Einbettung in Fibrowax wurde das Probenmaterial in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend schrittweise mit tertiärem Butanol und Fibrowax (Plano, Marburg, Germany) infiltriert.

Es erfolgten nacheinander Inkubationen in folgenden Lösungen (Tabelle 5):

Tabelle 5:

EtOH-Konzentration [%]	Inkubationszeit	Inkubations-temperatur [°C]
30	20 min	0
50	20 min	0
70	ü.N.	4
85	20 min	RT
90	20 min	RT
96	20 min	RT
96	20 min	RT
EtOH : *t*-BuOH		
3:1	30 min	RT
1:1	30 min	RT
1:3	30 min	RT
t-BuOH (100%)	30 min	30

Infiltrationslösung	Infiltrationszeit	Inkubations-temperatur [°C]
t-BuOH, bei 30°C mit Fibrowax gesättigt	5 h 30 min	30 42
t-BuOH, bei 42°C mit Fibrowax gesättigt	ü.N. 30 min	42 60
Fibrowax (100%)	ü.N	60

Die Entwässerung und anschließende Infiltration mit Butanol/Fibrowax erfolgte in 50 ml Reaktionsgefäßen, wohingegen der letzte Inkubationsschritt mit 100% Fibrowax in offenen Petrischalen erfolgte, um das Ausdampfen von Butanolresten zu ermöglichen. Nach abgeschlossener Infiltration wurden die Wurzelstücke in den Petrischalen ausgerichtet und die Petrischalen dann zur Aushärtung des Paraffins in einen Kühlschrank bei 4°C überführt. Die Wurzelproben konnten so über mehrere Monate bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.7.4 Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin

Die feste Haftung von Gewebsschnitten auf Objektträgern stellt eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche *In situ*-Hybridisierung dar. Um die erforderliche Bindung zu erreichen, wurden Objektträger mit Poly-L-Lysin beschichtet (Angerer et al., 1987).
Die Objektträger wurden zunächst 10 min in 0,2 N HCl gereinigt und dann kurz mit H_2O gespült. Nach je 10 min Inkubation in 100% EtOH und H_2O wurden sie für weitere 10 min in eine Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml H_2O; MG 70000-150000, Sigma) getaucht.
Anschließend wurden die Objektträger bei RT getrocknet und bis zu Verwendung staubfrei bei 4°C gelagert.

2.7.5 Schneiden der eingebetteten Wurzeln

Zum Schneiden der eingebetteten Wurzelproben wurde ein Mikrotom 2800 Frigocut E (Reichert-Jung) verwendet. Mit diesem Gerät konnte bei einer Temperatur von 4°C gearbeitet werden. Durch diese relativ niedrige Temperatur ist das Fibrowax härter, so daß starke Stauchungen, die zur Zerstörung der Schnittstruktur führen, vermieden werden. Dies erhöht insgesamt deutlich die Qualität der Schnitte (Reinold, 1995). Es wurden Wurzellängsschnitte mit einer Schnittdicke von 5-12 µm angefertigt. Je sechs bis zehn Parallelschnitte wurden auf mit Wasser benetzte, Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger überführt und ü.N auf einer Heizplatte bei 40°C getrocknet.

2.7.6 *In situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten RNA-Sonden

2.7.6.1 Vorbehandlung der Schnitte

Zunächst wurde das Fibrowax mit Xylol aus den Schnitten herausgelöst. Dazu wurden die Objektträger nacheinander 10 min in 100% Xylol, 5 min in Xylol:EtOH (1:1) und anschließend jeweils 5 min in 100%, 95%, 80%, 60% und 30% EtOH inkubiert. Nach Trocknen an der Luft konnten die Präparate bis zur weiteren Verwendung einige Tage bei 4°C gelagert werden.
Der Zugang von radioaktiv markierten Sonden zur zellulären RNA wird durch eine kontrollierte Proteolyse verbessert (Schmelzer et al., 1989). Die Schnitte wurden daher einem Pronaseverdau unterzogen. Hierzu wurden die Objektträger zunächst 5 min in 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0, dann 10 min in einer Lösung aus vorverdauter Pronase (Calbiochem; 250 µg/ml) inkubiert. Daraufhin erfolgte eine nochmalige Fixierung der Schnitte für 20 min in 1% Glutaraldehyd mit anschließender Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolkonzentrationsreihe (30%, 60%, 80%, 95% und 100% EtOH) und Trocknung an der Luft.

2.7.6.2 Hybridisierung mit radioaktiv markierten RNA-Sonden

Für jeden Objektträger wurden 10 µl Hybridisierungspuffer der folgenden Zusammensetzung hergestellt:

50 µl Formamid (deionisiert)
20 µl 50% Dextransulfat
6 µl 5 M NaCl
2 µl 50 x TE
2 µl 50 x Denhardt-Lösung, bestehend aus: Je 10 g/l Ficoll 400, Polyvinylpyrolidon und BSA in H_2O_{DEPC} (alle Chemikalien von Sigma)
6 µl 0,75 M DTT
4 µl H_2O_{DEPC}
10 µl ^{35}S-markierte RNA-Sonde, 1 ng/µl

Die Schnitte auf einem Objektträger wurden mit 10µl Hybridisierungspuffer bedeckt und mit einem Deckglas (20 x 20 mm) abgedeckt. Die Ränder des Deckglases wurden mit

einem 1:1-Gemisch aus Fixogum (Marabu) und Petroleumether abgedichtet. Die Objektträger wurden dann horizontal in eine Feuchtekammer gelegt und ü.N. bei 50°C inkubiert.

2.7.6.3 Waschen der Schnitte

Nach der Hybridisierung wurde die Fixogum-Abdichtung der Deckgläser mit einem Skalell entfernt, möglichst ohne die Deckgläser zu verschieben, da dies zu Beschädigungen des Schnittes führen kann. Die Objektträger wurden kurz in 1 x SSC getaucht, wobei sich bereits die meisten Deckgläser ablösten. Die Objektträger wurden nacheinander in folgenen Lösungen gewaschen:

Tabelle 6:

Lösungen	Inkubationszeit [min]	Inkubations-temperatur
1 x SSC	5	RT
1 x SSC, 50% Formamid, 10 mM DTT	45	45°C
1 x SSC, 50% Formamid, 10 mM DTT	45	45°C
1 x SSC, 10 mM DTT	5	RT
RNase-Puffer (0,5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) mit 20 µg/ml RNaseA	30	37°C
1 x SSC, 50% Formamid, 10 mM DTT	45	45°C
1 x SSC, 50% Formamid, 10 mM DTT	45	45°C
1 x SSC, 10 mM DTT	5	RT
1 x SSC, 10 mM DTT	5	RT

Anschließend wurden die Schnitte über eine aufsteigende Konzentrationsreihe von 30%, 60%, 80%, 90%, 95% und 100% EtOH entwässert und an der Luft getrocknet. Die Schnitte konnten nun zur mikroautoradiographischen Detektion eingesetzt werden.

2.7.7 Mikroautoradiographie zum Nachweis der Hybridisierungssignale

Der mikroautoradiographische Nachweis erfolgte nach Schmelzer et al. (1988). Alle Arbeitsschritte wurden in vollständiger Dunkelheit durchgeführt.

2.7.7.1 Beschichtung der Objektträger mit Fotoemulsion

In einem Wasserbad wurde NBT2-Filmemulsion (NBT Nuclear Track Emulsion, Technorama) bei 42°C geschmolzen und mit gleichem Vol. 0,6 M Ammoniumacetat verdünnt (Hafen et al., 1983). Die luftblasenfreie Beschichtung der Objektträger erfolgte durch Eintauchen in die Fotoemulsion. Die Objektträger wurden zum Trocknen für 2 h hochkant aufgestellt und danach in lichtdichte Dosen verpackt und bei 4°C zwei bis vier Wochen exponiert.

2.7.7.2 Entwicklung der Mikroautoradiogramme

Vor der Entwicklung wurden die lichtdichten Behälter mit den Objektträgern, Entwickler und Fixierer und Wasser 2 h bei 15°C inkubiert, um Temperaturunterschiede, die zu Rissen in der Fotoemulsion führen können, zu vermeiden. Zur Entwicklung wurden die Objektträger 2,5 min in Kodak D19 Entwickler getaucht, kurz mit H_2O gespült, 5 min in Kodak Unifix Fixierer fixiert, anschließend 20 min gewässert und bei RT an der Luft getrocknet.

2.7.7.3 Herstellung von Dauerpräparaten

Die getrockneten Schnitte wurden mit 30 µl Moviol-Lösung benetzt und mit einem Deckglas abgedeckt. Zur Herstellung des Moviol-Einbettungsmediums wurden 2,4 g Polyvinylethanol (Moviol 4-88, Hoechst) 2 h bei RT mit 6 g Glycerin und 6,4 ml H_2O inkubiert und nach Zugabe von 12 ml 0,2 M TrisHCl pH 8,5 bei 50°C für 10 min unter Rühren gelöst und 15 min bei 5000g zentrifugiert. Die so erhaltene Lösung wurde in 1 ml-Portionen bei 4°C gelagert.

2.7.7.4 Fotografische Dokumentation der Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierungen und Quantifizierung der Hybridisierungssignale

Dunkelfeldaufnahmen der Schnitte wurden mit einem Zeiss-Axiophot-Mikroskop angefertigt. Dazu wurde als Filmmaterial Kodak Ektachrom 320T Professional - Diafilm verendet.
Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes Image-Pro®-Plus (Version 4.1 für Windows™, Media Cybernetics, Silver Spring MD, U.S.A.) wurde die Silberkorndichte einer entsprechenden Fläche bestimmt. Dies erlaubt nähere Aussagen zur Transkriptlokalisation in Gewebsschnitten.

2.8 Bestimmung der Nitratreduktaseaktivität (NRA) von Pflanzen- und Pilzextrakten

2.8.1 Herstellung von Proteinrohextrakten aus Pflanzen- und Pilzmaterial

Tomatenwurzeln, Tomatenblätter oder isoliertes Myzel von *Glomus intraradices* Sy167 wurden sofort nach der Ernte mit Flüssigstickstoff in einer Reibschale zu einem feinen Pulver gemörsert. Von diesem Pulver wurden 200-400 mg mit 1ml NR-Extraktionspuffer (modifiziert nach Kaiser und Huber, 1994; Lohaus et al., 1998) versetzt, gut gemischt und bei 4°C und 18300g für 30 s abzentrifugiert.

<u>NR-Extraktionspuffer</u>:

100 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazin-*N´*-2-ethansulfonsäure (HEPES)-KOH, pH 7,5 (Serva)
10% (v/v) Glyzerin (Merck)
1 mM EDTA (Merck)
5 mM Mg-Acetat (Merck)
0,1% (v/v) Triton X100 (Sigma)

0,5% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA, Sigma)
5 µM Na-Molybdat (Merck)
1% (w/v) Polyvinylpolypyrolidon (PVPP,Sigma)
5 mM Dithiothreitol (DTT, Sigma)
25 µM Leupeptin (Sigma)
0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Roche)
20 µM Flavinadenindinukleotid (FAD, Roche)

2.8.2 Messung der Nitratreduktaseaktivität in Proteinrohextrakten

Die Aktivität der Nitratreduktase wurde *in vitro* durch Messung der Konzentration von Nitrit als Produkt der enzymatischen Umsetzung von Nitrat zu Nitrit nach der folgenden Reaktionsgleichung bestimmt:

$NO_3^- + NAD(P)H + H^+ \rightarrow NO_2^- + NAD(P)^+ + H_2O$

Jeweils 50 µl des Überstandes (Rohextrakt) wurden zu 300 µl Reaktionspuffer gegeben, gut gemischt und 30 min bei 30°C inkubiert.

<u>NR-Reaktionspuffer</u>

100 mM HEPES-KOH pH 7,5 (Serva)
6 mM KNO_3 (Merck)
6 mM EDTA (Merck)
0.5 mM NADH oder
0,5 mM NADPH (beides Roche)

Der Nitritgehalt der Proben wurde mit der Gries-Ilovay Methode (modifiziert; nach Snell und Snell, 1949) bestimmt. Lösungen von Sulfanil-Essigsäure und α-Naphthyl-Essigsäure (s.u.) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt.
Jeweils 1 ml dieses Gemisches wurde mit 300 µl Probe versetzt, gut gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion des entstehenden rot-violetten Farbtoffes bei 540 nm in einem Spektralphotometer (PM6, Zeiss) gemessen. Aufgrund der linearen Abhängigkeit einer Eichkurve im Nitrit-Konzentrationsbereich von 0,01-1 mM wurden die Nitritkonzentrationen der Proben durch Mitführen eines Eichwertes (0,1 mM NO_2^-) bestimmt. Die Bezugsgröße für die Nitratreduktaseaktivitäten ist das Frischgewicht der Proben, da die Anwesenheit von BSA im Extraktionspuffer eine Proteinbestimmung der eingesetzten Proben unmöglich macht.

Zur Herstellung von Sulfanil-Essigsäure wurden 3,3 g Sulfanilsäure in 750 ml H_2O gelöst und mit 250 ml Eisessig versetzt.
Für die α-Naphthyl-Essigsäure wurde 1 g α-Naphthylamin in 250 ml Eisessig gelöst und mit H_2O auf 1 l aufgefüllt.

2.9 Computer-Analyse von DNA- und Proteinsequenzen

2.9.1 DNA-Sequenzanalyse und Translation von DNA-Sequenzen

Die Analyse von DNA-Sequenzdaten, d.h. die Invertierung und Translation von DNA-Sequenzen und die Ermittlung offener Leseraster erfolgte mit dem Computerprogramm „Sequency" von Dr. Wofgang Zimmer und Dr. Thomas Kentemich (ehemals im Labor von Prof. Bothe, Köln) sowie mit dem über das Internet verfügbaren Analyseprogrammpaket „DNA and Protein Analysis Toolkit"
(http://www.rockefeller.edu/rucs/toolkit/translate.html).

2.9.2 Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen

Zur Ermittlung von Sequenzhomologien bei DNA- und Proteinsequenzen wurde das Programm „Clustal W, Version 1.5" eingesetzt (Thompson et al., 1994).

2.9.3 Primeranalyse

Die Analyse und Auswahl von nicht degenerierten Primersequenzen erfolgte mit Hilfe der in Internet frei verfügbaren PCR-Software *„Primers!"* und „Primer-Calculator" unter http://www.williamstone.com/primers/.

2.9.4 Benutzung von Datenbanken

Unter Verwendung des Programms BLAST 2.0 (Altschul et al., 1997, Altschul et al., 1990) wurden homologe DNA und Proteinsequenzen ermittelt. Der BLAST-Server ist über die Homepage des NCBI (National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) zugänglich.
Der Zugang zu in Datenbanken abgelegten DNA- und Aminosäuresequenzen erfolgte über das „Sequence Retrieval System" des EMBL, Heidelberg (http://www.embl-heidelberg.de/srs5/).

3. Ergebnisse

3.1 PCR-Amplifizierung von DNA-Segmenten aus Genen, die für Bestandteile des Nitratassimilationssystems höherer Pflanzen kodieren

Ein wesentlicher Faktor bei der Amplifizierung von Gensegmenten unbekannter Sequenz mit Hilfe der PCR ist eine vorangegangene Analyse der DNA- und Aminosäuresequenz homologer Gene unterschiedlicher Organismen. Aus dem Vergleich der Aminosäuresequenzen von Proteinbereichen, die möglicherweise für die Funktion des Proteins von besonderer Bedeutung sind und daher eine hohe Konservierung aufweisen, lassen sich Bereiche ermitteln, die als Vorlage zur Synthese von Oligonukleotidprimern geeignet erscheinen. Insbesondere sind hochkonservierte Bereiche mit verstärktem Auftreten der Aminosäuren (AS) Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Histidin, Lysin, Methionin, Tryptophan oder Tyrosin geeignet, da diese durch nur jeweils ein oder zwei Nukleotid-Tripletts kodiert sind. Oligonukleotidprimer, deren Sequenzen auf solch hochkonservierten Bereichen basieren, ermöglichen die Amplifizierung entsprechender Regionen aus Genfamilien verschiedener Spezies (McPherson et al., 1991). Bei der Verwendung von degenerierten Primern, d.h. einem Primergemisch, das die verschiedenen Triplettmöglichkeiten der zugrunde liegenden Aminosäuren abdeckt, ist für die spezifische Bindung der Primer an die Zielsequenz und damit eine erfolgreiche Amplifizierung, die 100%ige Übereinstimmung der äußersten drei Nukleotide am 3´-Ende der Oligonukleotidprimer mit der Zielsequenz erforderlich (McPherson et al., 1991).
Aufgrund der teilweise unübersichtlichen Nomenklatur bei Nitrattransportergenen höherer Pflanzen werden in dieser Arbeit die in der Literatur gebräuchlichen Benennungen durch vereinfachte Bezeichnungen ersetzt. Diese Maßnahme soll durch eine sofort ersichtliche Zuordnung zu den beiden Nitrattransporterfamilien Verwechslungsmöglichkeiten minimieren. So werden Mitglieder der low-affinity Nitrattransporterfamilie mit dem Kürzel „-lo“ und einer entsprechenden Nummer versehen. Mitglieder der high-affinity Nitrattransporterfamilie werden durch den Zusatz „-hi“ und mit einer entsprechenden Zahl gekennzeichnet. Diese Zahlen vermitteln keinerlei Informationen zu Homologie, Funktion oder Regulation der einzelnen Gene der verschiedenen Pflanzenspezies, sondern dienen lediglich der Nummerierung. In Tabelle 7 sind die abgeänderten Bezeichnungen aufgelistet. Da für die meisten bekannten Sequenzen der Mitglieder beider Nitrattransporterfamilien (low- und high-affinity) ein direkter Nachweis der Funktion ihrer Genprodukte noch aussteht, sind diese mit der Ausnahme von CHL1 aus *Arabidopsis* und *Brassica-lo1* als putative Nitrattransporter anzusehen. Aus Gründen der Vereinfachung wird im weiteren auf eine ausdrückliche Bezeichnung als mutmaßliche oder putative Nitrattransporter verzichtet.

3.1.1 Identifizierung konservierter Sequenzbereiche in Nitrattransportergenen höherer Pflanzen

Zur Entwicklung von Primern, die die Amplifizierung von Teilsegmenten von low- und high-affinity Nitrattransportergenen ermöglichen sollten, wurden zunächst die zu diesem Zeitpunkt bereits publizierten Sequenzen auf Aminosäureebene miteinander verglichen (Abb.5 und Abb.6). Ziel der durchgeführten Sequenzvergleiche war es, möglichst universelle Primer zu entwickeln, die eine Vielzahl verschiedener Nitrattransportergensequenzen in unterschiedlichen Organismen amplifizieren können. Da es sich bei den zugrundeliegenden Sequenzen um cDNA-Sequenzen handelte, bestand mit genomischer DNA als PCR-Matrize die Gefahr, daß sich innerhalb der gewählten Primersequenzen auf Ebene der genomischen DNA Introngrenzen befinden, die eine erfolgreiche Amplifizierung verhin-

dern könnten. Dieses Problem wurde in weiteren Versuchen (siehe Abschnitt 3.1.6.2) durch Einsatz von cDNA als PCR-Matrize gelöst.

Tabelle 7:

neue Bezeichnung	Organismus	übliche Nomenklatur	Verfasser
Arabidopsis-hi1	*A. thaliana*	*AtNRT2;1 ; ACH1*	Zhou et al., 1999
Arabidopsis-hi2	*A. thaliana*	*AtNRT2;2 ; ACH2*	Zhou et al., 1999
Arabidopsis-hi3	*A. thaliana*	*AtNRT2;3*	- (AB015472)
Arabidopsis-hi4	*A. thaliana*	*AtNRT2;4*	- (AB015472)
Arabidopsis-lo1	*A. thaliana*	*CHL1*	Tsay et al., 1993
Arabidopsis-lo2	*A. thaliana*	*AtNRT1;2 ; NTL1*	Huang et al., 1999
Brassica-lo1	*Brassica napus*	*BnNRT1*	Muldin und Ingemarsson, 1995
Gerste-hi1	*Hordeum vulgare*	*HvNRT2;1 ; BCH1*	Trueman et al., 1996
Gerste-hi2	*Hordeum vulgare*	*HvNRT2;2 ; BCH2*	Trueman et al., 1996
Gerste-hi3	*Hordeum vulgare*	*HvNRT2;3 ; BCH3*	Vidmar et al., 2000
Gerste-hi4	*Hordeum vulgare*	*HvNRT2;4 ; BCH4*	Vidmar et al., 2000
Reis-lo1	*Oryza sativa*	*OsNRT1*	Lin et al., 2000
Soja-hi1	*Glycine max*	*GmNRT2;1*	Amarasinghe et al., 1998
Tabak-hi1	*N. plumbaginifolia*	*NpNRT2;1/ NRT2;1Np*	Quesada et al., 1997
Tomate-hi1	*L. esculentum*	*LeNRT2;1*	Ono et al., 2000
Tomate-hi2	*L. esculentum*	*LeNRT2;2*	Ono et al., 2000
Tomate-lo1	*L esculentum*	*LeNRT1;1 (lemit1)*	Lauter et al., 1996
Tomate-lo2	*L. esculentum*	*LeNRT1;2 (lenit2)*	Lauter et al., 1996

3.1.1.1 Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von low-affinity Nitrattransportern

Durch Vergleich der aus den o.a. DNA-Sequenzen ermittelten AS-Sequenzen konnten zwei hochkonservierte Bereiche ermittelt werden, die sich als Vorlage zur Synthese von Oligonukleotidprimern eigneten (Abb. 5). Diese sollten auf cDNA-Ebene die Amplifizierung eines Bereiches von etwa 500 bp ermöglichen

Abbildung 5: Vergleich der zur Primersynthese verwendeten AS-Sequenzbereiche

Arabidopsis-lo1 ^{50}GIGVNLV**TYLTGTMHL**GNATAANTV^{74}
Tomate-lo1 ^{51}GIAVNLV**TYLTGTMHL**GNASSANNV^{75}
Tomate-lo2 ^{51}GIAVNLV**TYLTGTMHL**GNATAANNV^{75}
PNT1

Arabidopsis-lo1 ^{207}VLVYVQDDVGR**KWGYGICA**FAIVL^{230}
Tomate-lo1 ^{207}ILVYIQDNLGR**EWGYGICA**CAIVI^{230}
Tomate-lo2 ^{207}ILVYVQDNLGR**EWGYGICA**CAIVI^{230}
PNT2

Legende zu Abbildung 5: Darstellung der zur Synthese der Primer PNT1 und PNT2 verwendeten AS-Sequenzen (fett hervorgehoben) von low-affinity Nitrattransportern aus *Arabidopsis* (*Arabidopsis-lo1*) und Tomate (*Tomate-lo1* und *Tomate-lo2*).

3.1.1.2 Identifizierung konservierter Sequenzbereiche von high-affinity Nitrattransportern

Die zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden drei DNA-Sequenzen aus höheren Pflanzen erlaubten nach Vergleich die Synthese der degenerierten Oligonukleotidprimer PNT3 und PNT4 aus den in Abbildung 6 dargestellten AS-Sequenzbereichen. Diese Primer umfassen auf cDNA-Ebene einen zu amplifizierenden Bereich von etwa 900 bp.

Abbildung 6:

Tabak-hi1	^{160}MIGFSLAT**FVSCQYWM**STMFNSQII^{185}
Gerste-hi1	^{137}LIGFSLAT**FVSCQYWM**STMFNSKII^{162}
Gerste-hi2	^{139}LIGFSLAT**FVSCQYWM**STMFNSKII^{164}
	→ PNT3

Tabak-hi1	^{451}GCTLPVTLC**HFPQWGSM**FFPPTKDP^{475}
Gerste-hi1	^{428}ACTLPVALV**HFPQWGSM**FFPASADA^{452}
Gerste-hi2	^{430}ACTLPVALV**HFPQWGSM**LLPPNANA^{454}
	← PNT4

Legende zu Abbildung 6: Darstellung der zur Synthese der Primer PNT3 und PNT4 verwendeten high-affinity Nitrattransporter-AS-Sequenzen (fett hervorgehoben) aus Tabak *(Tabak-hi1*) und Gerste (*Gerste-hi1* und *Gerste-hi2*).

3.1.2 Vergleich von AS-Sequenzen zweier Nitritreduktase-AS-Sequenz-Bereiche

Als Grundlage zur Synthese von Oligonukleotidprimern zur Amplifizierung einer Tomaten-Nitritreduktase-Teilsequenz dienten die abgeleiteten AS-Sequenzen von drei Tabak-Nitritreduktase cDNA-Sequenzen sowie AS-Sequenzen von Nitritreduktasen aus Mais (*Zea mays*) und Spinat (*Spinacia oleracea*) (Kronenberger et al., 1993).
Die ausgewählten Oligonukleotidprimer (Abb.7) führen auf cDNA-Ebene zu PCR-Produkten von erwarteten 540 bp Länge, die den für die Sirohäm-Bindungsdomäne der Nitritreduktase kodierenden Bereich enthalten.

Abbildung 7:

Mais	^{298}RDLGSRGNR**QKTRMMWL**IDELGMEV^{324}
Spinat	^{329}RDLGFRGNR**QKCRMMWL**IDELGMEA^{353}
nir1	^{318}RDLGFRGNR**QKCRMMWL**IDELGVEG^{342}
nir2	^{160}RDLGTRGNR**QKTRMMWL**VDELGVEG^{184}
nir3	^{191}RDLGFRGNR**QKCRMMWL**IDELGVEG^{215}
	→ TNirF2

Mais	^{471}KRVAVPRPVR**MHWTGCPN**SCGQVQV^{495}
Spinat	^{499}RLVSVTRPVR**MHWTGCPN**SCGQVQV^{523}
nir1	^{487}RQVSLTRPVR**MHWTGCPN**TCAQVQV^{511}
nir2	^{330}RLVSVTKPVR**MHWTGCPN**^{347}----
nir3	^{360}RQVSLTKPVR**MHWTGCPN**TCAQVQV^{384}
	← TNirR1

Legende zu Abbildung 7: Darstellung der zur Synthese der Primer TNirF2 und TNirR1 verwendeten Nitritreduktase-AS-Sequenzen (fett hervorgehoben) aus Tabak (nir1, nir2, nir3), Mais und Spinat (Kronenberger et al., 1993).

3.1.3 Primer für die Amplifizierung eines Segmentes aus dem Nitratreduktasegen von Tomate

Die degenerierten Oligonukleotidprimer PL1 und PL2, die von Kaldorf et al. (1998) zur Amplifizierung eines Teilsegmentes eines Nitratreduktasegens von Mais verwendet worden waren, wurden nun auch zur Amplifizierung eines Teilbereiches des Nitratreduktasegens von Tomate eingesetzt (Daniel-Vedele et al., 1989). Die Sequenzen dieses Primerpaares waren von Kaldorf et al. (1998) anhand von AS-Sequenzen aus Bereichen der Molybdän-Bindungsdomäne der Nitratreduktase ermittelt worden. Die zu erwartende Amplifikatgröße liegt bei Tomate aufgrund des Vorhandenseins eines Introns von 74 bp Länge bei 544 bp (Daniel-Vedele et al., 1989).

3.1.4 Resultate der PCR-Experimente

3.1.4.1 PCR-Experimente zur Gewinnung von Gensonden für Nitrattransporter höherer Pflanzen

Die Amplifizierung von Segmenten aus low-affinity Nitrattransportergenen erfolgte zunächst mit dem Primerpaar PNT1/PNT2. Da zu Beginn dieser Arbeit bereits Sequenzen von Nitrattransportergenen aus *Arabidopsis* und Tomate vorlagen, wurde versucht, mit DNA aus beiden Organismen spezifische PCR-Produkte zu erhalten. Mit isolierter genomischer DNA aus *Arabidopsis* und Tomate konnten bei einer Primerbindungstemperatur von 50°C und nach 40 PCR-Zyklen Amplifikate erhalten werden. Mit DNA aus *Arabidopsis* traten deutlich sichtbare Amplifikate von etwa 600 und 750 bp Länge und bei Tomate von etwa 490 bp Länge auf (Abb.8).
Die Klonierung der 490 bp-Amplifikatbande aus Tomate in den Vektor pGEM®-T Easy (Kapitel 2.4) und anschließende Sequenzierung des Inserts zeigte, daß keinerlei Homologien zu den bekannten low-affinity Nitrattransportersequenzen vorlag und es sich somit um ein unspezifisches Amplifikat handelte. Die nach der Klonierung durchgeführte Sequenzierung des 750 bp-Amplifikates aus *Arabidopsis* ergab eine eindeutige Identifizierung des klonierten Segmentes als Teil von *Arabidopsis-lo1*.
Aus diesem Insert wurde mit Hilfe der PCR und den internen Primern CHL1 und CHL2 eine Dig-markierte Sonde von 297 bp Länge (Nukleotide 442-739; gbL10357) hergestellt, die keine Intronsequenz enthielt. Diese wurde zur heterologen Hybridisierung mit PCR-Produkten aus Tomate eingesetzt (siehe Abbildung 9).

Abbildung 8:

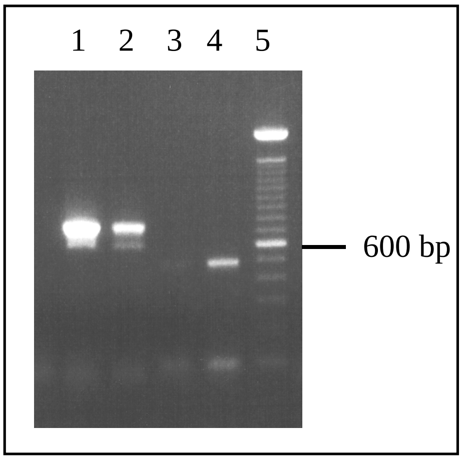
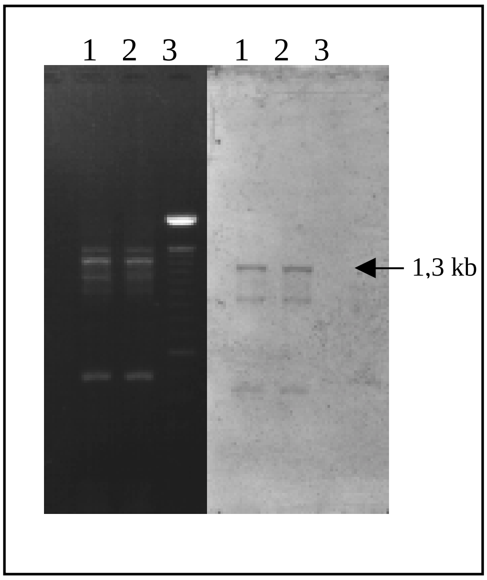


Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse der PCR mit den Primern PNT1 und PNT2.

Spur 1: PCR mit 100 ng *Arabidopsis*-DNA
Spur 2: PCR mit 50 ng *Arabidopsis*-DNA
Spur 3: PCR mit 50 ng Tomaten-DNA
Spur 4: PCR mit 100 ng Tomaten-DNA
Spur 5: Längenstandard, 100 bp-Leiter (Gibco)

Die Reaktion umfaßte 40 Zyklen bei einer Primerbindungstemperatur von 50°C. 8 µl der PCR-Produkte wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt.

Abbildung 9:



PCR-Reaktion und heterologe Hybridisierung von PCR-Produkten ausgehend von je 100 ng DNA aus Tomate mit den Primern PNT1 und PNT2 (Spuren 1 und 2). Spur 3: 100 bp Längenstandard (Gibco). Die PCR-Methode umfaßte 10 Zyklen mit einem „touch-down“ der Primerbindungstemperatur von 60°C auf 40°C (2°C/Zyklus) und 30 Zyklen bei 50°C.
Die Färbung des Nylon-Filters erfolgte mit NBT/BCIP (siehe Abschnitt 2.6.6).

Zur Amplifizierung von high-affinity Nitrattransportergensegmenten höherer Pflanzen (*Arabidopsis*, Mais, Tabak und Tomate) wurden PCR-Experimente mit dem Primerpaar PNT3/PNT4 durchgeführt. Mit DNA aus *Arabidopsis*, Tabak und Tomate konnten Amplifikatbanden mit einer Größe von 1,0 bis 1,1 kb erhalten werden (Abbildung 10). Nach Gelelution, Klonierung und Ansequenzieren wurden zwei unterschiedliche Klone aus *Arabidopsis* (A3-1 und A3-29) und Tomate (T1-6 und T1-7) sowie ein Klon aus Tabak (Np2-2) identifiziert, deren Plasmid-Inserts deutliche Homologien zu den bereits publizierten high-affinity Nitrattransporterhomologen aus höheren Pflanzen aufwiesen bzw. im Falle von Np2-2 im sequenzierten kodierenden Bereich mit diesen identisch waren.

3.1.4.2 PCR-Amplifizierung eines Segmentes des Nitratreduktasegens von Tomate

Ausgehend von 100 ng DNA aus Tomate wurde ebenfalls mit einer „touchdown-PCR“-Methode (siehe Kapitel 2.3.2) ein spezifisches PCR-Produkt von erwarteten 544 bp Länge erhalten (Abbildung 11). Nach Gelelution, Klonierung und Sequenzierung konnte die Identität des Amplifikates als Teil des Gens für die assimilatorische Nitratreduktase von Tomate bestätigt werden.

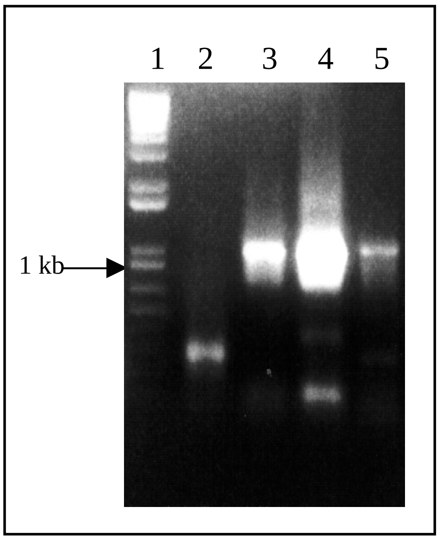


Abbildung 10:

PCR-Experiment mit dem Primerpaar PNT3/PNT4 zur Amplifizierung von Segmenten aus high-affinity Nitrattransportergenen. Die PCR-Methode bestand aus 7 Zyklen mit einem „touch-down“ der Primerbindungstemperatur von 54°C auf 40°C (2°C/Zyklus) und weiteren 33 Zyklen bei einer Primerbindungstemperatur von 50°C. 8 µl der PCR-Produkte wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt.

Spur 1: Längenstandard 1 kb-Leiter (1 kb-Plus, Gibco)
Spur 2: 100 ng DNA aus Mais
Spur 3: 100 ng DNA aus Tomate
Spur 4: 100 ng DNA aus *Arabidopsis*
Spur 5: 100 ng DNA aus Tabak

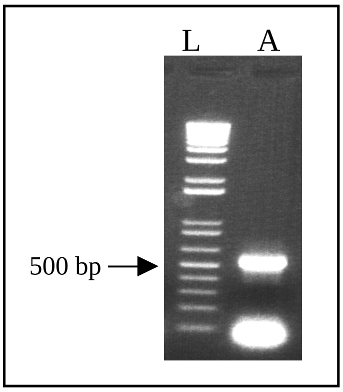


Abbildung 11:

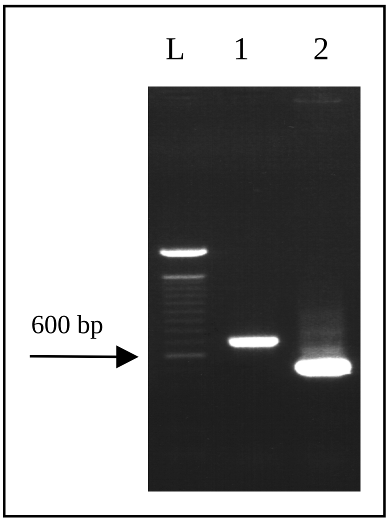
Zur Isolierung einer Gensonde aus dem NR-Gen von Tomate wurden 100 ng genomische DNA in einen PCR-Ansatz mit dem Primerpaar PFL1/PFL2 eingesetzt. Die PCR-Methode bestand aus 5 Zyklen mit einem „touchdown“ der Primerbindungstemperatur von 54°C auf 44°C um 2°C pro Zyklus und weiteren 30 Zyklen bei 54°C.
8 µl des PCR-Produktes wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt (A). Als Längenstandard diente die 1 kb-Plus Leiter von Gibco (L).

3.1.4.3 PCR-Amplifizierung eines Segmentes eines Nitritreduktasegens von Tomate

Zur Isolierung einer Gensonde für die assimilatorische Nitritreduktase (NiR) von Tomate wurde in PCR-Reaktionen mit dem Primerpaar TNiRF2/TNiRR1 sowohl genomische DNA als auch Tomatenwurzel-cDNA (Kapitel 2.3.3.1) als Matrize eingesetzt. Die PCR führte mit genomischer DNA zur Amplifizierung eines etwa 700 bp großen Segmentes, wohingegen bei Verwendung von cDNA ein Amplifikat von ca. 540 bp entstand (Abbildung 12). Dieses Resultat deutet auf das Vorkommen eines Introns innerhalb des amplifizierten Segmentes auf Ebene der genomischen DNA hin.

Abbildung 12:

Zur Isolierung einer Gensonde aus einem NiR-Gen von Tomate wurden 100 ng genomische Tomaten-DNA (Spur 1) und 1 µl Tomatenwurzel-cDNA-Erststrang (Spur 2) mit dem Primerpaar TNiRF2/TNiRR1 in PCR-Ansätze eingesetzt. Die PCR-Methode bestand aus 40 Zyklen mit einer Primerbindungstemperatur von 52°C. Je 8 µl der PCR-Produkte wurden auf 1% Agarosegelen bei 10 V/cm aufgetrennt. Als Längenstandard (L) diente die 100 bp-Leiter (Gibco).



3.1.5 Analyse der PCR-Produkte – Klonierung und Sequenzierung von Teilsegmenten von Nitrattransporter-, Nitratreduktase- und Nitritreduktasegenen

Das zum intensivsten Hybridisierungssignal führende 1,3 kb PCR-Produkt aus Abbildung 9 wurde, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, nach Gelelution kloniert (T2-2) und vom 5´-Ende her ansequenziert. Der Datenbankvergleich ergab in den sequenzierten kodierenden Bereichen eine 100%ige Übereinstimmung mit der von Lauter et al. (1996) publizierten *Tomate-lo1*-cDNA-Sequenz eines low-affinity Nitrattransporters aus Tomate. Das Leseraster wird durch zwei mutmaßliche Intronbereiche von 87 bp und etwa 0,7 kb unterbrochen (siehe Anhang).
Mit dem Primerpaar PNT1/PNT2 konnten somit aus *Arabidopsis* und Tomate Bereiche aus low-affinity-Nitrattransportergenen kloniert werden. Die Primer PNT1 und PNT2 sind zur Amplifizierung einer Teilsequenz von low-affinity Nitrattransportergenen höherer Pflanzen aus unterschiedlichen Spezies und Familien geeignet.
Nach Gelelution und Klonierung wurden die mit dem Primerpaar PNT3/PNT4 erhaltenen PCR-Produkte von beiden Seiten über einen Bereich von jeweils etwa 300 bp sequenziert (siehe Anhang). Diese Bereiche umfassen die für die mutmaßlichen Transmembrandomänen 3-6 und 10-12 kodierenden Sequenzen von high-affinity Nitrattransportergenen. Es konnten zwei unterschiedliche Klone aus *Arabidopsis* (A3-1 und A3-29) und Tomate (T1-6 und T1-7), sowie ein Klon aus Tabak (Np2-2) identifiziert werden, die deutliche Homologien bzw. Identitäten zu den bereits publizierten high-affinity Nitrattransporterhomologen aus höheren Pflanzen aufweisen (siehe Abb.13). Die Insertsequenz des Klons Np2-2 stimmt ausgehend von Primer PNT3 über einen Bereich von 285 bp exakt mit der von Quesada et al. (1997) publizierten cDNA-Sequenz (*Tabak-hi1*) aus *Nicotiana plumbaginifolia* überein. Unmittelbar im Anschluß an diesen Bereich ist jedoch keine Sequenzhomologie zu beobachten. Aufgrund der Verwendung von genomischer DNA als PCR-Matrize könnte ein Intron den abrupten Homologieabbruch erklären. Deutliche Consensus-Spleißstellen sind jedoch nicht zu erkennen. Eine Zusammenfassung der erhaltenen Resultate ist in Tabelle 8 aufgeführt.
Die Klone A3-1, A3-29, T1-6 und T1-7 weisen auf Aminosäureebene alle das für Mitglieder der high-affinity Nitrattransporter-Familie typische, hochkonservierte Sequenzmotiv A/G-G-W/L-G-N-M-G in der mutmaßlichen Transmembrandomäne 5 auf (siehe Abb.13).

Der *Arabidopsis* Klon A3-1 zeigt im BLAST-Vergleich (Altschul et al., 1997) auf Nukleotidebene über einen Bereich von 286 bp eine mit 83% signifikante Homologie zu einer DNA-Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* (Chromosom 5, P1Klon: MAE1; AB015472). Auf AS-Ebene in einem Bereich von 113 AS weist A3-1 hingegen Sequenzidentitäten von 71% zu *Arabidopsis-hi1* und 72% zu *Arabidopsis-hi2* auf.
A3-29 zeigt demgegenüber auf DNA-Sequenzebene (siehe Kapitel 7.2) in einem Bereich von 576 bp eine 100%ige Übereinstimmung mit der publizierten *Arabidopsis*-cDNA-Sequenz *Arabidopsis-hi2* und eine 92%ige Identität zu *Arabidopsis-hi1* (Zhuo et al. 1999). Bei A3-29 handelt es sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Segment des high-affinity Nitrattransportergens *Arabidopsis-hi2*, wohingegen A3-1 aufgrund der vorliegenden Sequenzvergleiche Segment eines bisher unbekannten zu high-affinity Nitrattransportern homologen Gens sein könnte.
Die erhaltenen DNA-Sequenzen des Klons T1-6 sind zu 99% mit den von Ono et al. (2000) publizierten cDNA-Sequenzen *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* identisch, die innerhalb des offenen Leserasters nur 22 unterschiedliche Basenpaare besitzen. Der Klon T1-7 weist innerhalb des sequenzierten Bereichs (396 bp) gegenüber den publizierten Sequenzen *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* eine Identität von nur 85% auf.
Da die beiden Klone T1-6 und T1-7 von beiden Seiten über einen Bereich von etwa 300 bp sequenziert wurden (siehe Kapitel 7.2), konnten nach Translation der DNA-Sequenz zwei Bereiche mit einer Länge von jeweils etwa 80-100 AS für einen Vergleich mit den publizierten Sequenzen eingesetzt werden. Die beiden publizierten high-affinity Nitrattransporter-Sequenzen aus Tomate, *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2*, unterscheiden sich innerhalb des offenen Leserasters um nur 22 Nukleotide. Dies führt zu nur zwei unterschiedlichen AS (Ono et al., 2000). Auf AS-Ebene ergeben sich für T1-6 somit Identitäten von 99% in einem Bereich von 182 AS zu *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2*. Der Klon T1-7 hingegen weist zu den publizierten Sequenzen von Tomate in einem Bereich von 163 AS eine AS-Identität von 92% zu *Tomate-hi1* und 93% zu *Tomate-hi2* auf. Die größte Identität ergibt sich jedoch mit 95% zu *Tabak-hi1*. Bei T1-7 handelt es sich demnach mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Teilbereich eines bisher unbekannten, zu high-affinity Nitrattransportern homologen Gens aus Tomate. Die geringen Unterschiede, die zwischen T1-6 und den beiden publizierten Sequenzen (*Tomate-hi1* und *Tomate-hi2*) auftreten, könnten auf im Elektropherogramm nicht erkennbare Sequenzierfehler zurückzuführen sein.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Resultate der PCR-Experimente

PCR-Produkt	Primerpaar	Länge	höchste Identität zu		identische Nukleotide
T1-6	PNT3/PNT4	1,05 kb	*Tomate-hi1* *Tomate-hi2*	embAF092655 embAF092654	99% (674 bp)
T1-7	PNT3/PNT4	1,05 kb	*Tabak-hi1*	embY08210	85% (485 bp)
A3-1	PNT3/PNT4	0,95 kb	*Arabidopsis*	gbAB015472	83% (286 bp)
A3-29	PNT3/PNT4	1,1 kb	*Arabidopsis-hi2*	embAF019749	100% (576 bp)
Np2-2	PNT3/PNT4	1,0 kb	*Tabak-hi1*	embY08210	100% (285 bp)
T2-2	PNT1/PNT2	1,3 kb	*Tomate-lo1*	embX92853	100% (457 bp)
T3-1	PL1/PL2	544 bp	*Tomate-NIA*	embX14060	100% (544 bp)
TNir2-1	TNiRF2/TNIRR1	533 bp	*Tabak-nir1*	embX66145	90% (533 bp)

Legende zu Tabelle 8: Auflistung der klonierten PCR-Produkte, deren Länge, die zur Amplifizierung eingesetzten Primerpaare sowie die Sequenzen, zu denen die jeweils höchsten Homologien in einer BLAST-Analyse (Altschul et al., 1997) auftreten. Der Prozentsatz identischer Nukleotide bezieht sich mit Ausnahme von T3-1 auf die sequenzierten mutmaßlich kodierenden Bereiche der klonierten DNA-Segmente. Die Längen dieser Bereiches sind jeweils in Klammern angegeben.

Abbildung 13: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Transmembrandomänen 5, 6, 11 und 12 verschiedener Mitglieder der pflanzlichen high-affinity Nitrattransporter-Familie mit den Klonen A3-1, A3-29, T1-6 und T1-7:

```
                              4                        5
Tabak-hi1               FVSCQYWMSTMFNSQIIGLVNGTAAGWGNMGGGATQLIMPILYDII
Gerste-hi1              FVSCQYWMSTMFNSKIIGTVNGLAAGWGNMGGGATQLIMPLVFHAI
Arabidopsis-hi1         FVSCQYWMSTMFNSQIIGLVNGTAAGWGNMGGGITQLLMPIVYEII
Arabidopsis-hi2         FVSCQYWMSTMFNSQIIGLVNGTAAGWGNMGGGITQLLMPIVYEII
Arabidopsis A3-1        FVSCQYWMSVMFTGKIIGLVNGCAGGWGNMGGGVTQLLMPMVFHVI
Arabidopsis A3-29       FVSCQYWMSTMFNSQIIGLVNGTAAGWGNMGGGITQLLMPIVYEII
Tomate-hi1              FVSCQYWMSTMFNSKIIGLVNGTAAGWGNMGGGATQLIMPLLYDII
Tomate-hi2              FVSCQYWMSTMFNSKIIGLVNGTAAGWGNMGGGATQLIMPLLYDII
Tomate T1-6             FVSCQYWMSTMFNSKIIGLVNGTAAGWGNMGGGATQLIMPLLYDII
Tomate T1-7             FVSCQYWMSTMFNSQIIGLVNGTAAGWGNMGGGATQLIMPLLYDII
                                * **   ******* * ******** *** **     *
```

```
                                     6
Tabak-hi1               RKAGATPFTAWRIAFFIPGWLHVVMGILVLTLGQDLPDGNRGDLQKK
Gerste-hi1              QKCGATPFVAWRIAYFVPGMMHIVMGLLVLTMGQDLPDGNLASLQKK
Arabidopsis-hi1         RRCGSTAFTAWRIAFFVPGWLHIIMGILVLNLGQDLPDGNRATLEKA
Arabidopsis-hi2         RRCGSTAFTAWRIAFFVPGWLHIIMGILVLTLGQDLPGGNRAAMEKA
Arabidopsis A3-1        KLTGATPFTAWRFAFFIPG............................
Arabidopsis A3-29       RRCGSTAFTAWRIAFFVPGWLHIIMGILVLTLGQDLPGGNRAAME..
Tomate-hi1              RRAGATPFTAWRIAFFIPGWLHVVMGILVLTLGQDLPDGNRGTLQKT
Tomate-hi2              RRAGAIPFTAWRIAFFIPGWLHVVMGILVLTLGQDLPDGNRGTLQKT
Tomate T1-6             RRAGATPFTAWRIAFFIPGWLHVVMGILVLTLGQDLPDGNRGTLQKT
Tomate T1-7             RRAGATPFTAWRIAFFIPGWLHVIMGILVLTLGQDLPDGNLASLQKK
                           * * ***** * * *** *  ******  ***** **     *
```

```
                                      10                 11
Tabak-hi1               GGVSKDKFT----CGATFGIIPFISRRSLGIISGMTGAGGNFGSGLT
Gerste-hi1              GDGDMAKDK----CGAIFGVAPFVSRRSLGIISGLTGAGGNVGAGLT
Arabidopsis-hi1         GEVAKDKFG----CGATFAIVPFVSRRALGIISGLTGAGGNFGSGLT
Arabidopsis-hi2         GEVAKDKFG----CGATFAIVPFVSRRALGIISGLTGAGGNFGSGLT
Arabidopsis A3-1        .........----CGATFGVAPFVSRRSLGLISGLTGAGGNFGSGVT
Arabidopsis A3-29       .........----CGATFAIVPFVSRRALGIISGLTGAGGNFGSGLT
Tomate-hi1              GTVAKDKFG----CGATFGIIPFISRRSLGIISGMTGAGGNFGSGLT
Tomate-hi2              GTVAKDKFG----CGATFGIIPFISRRSLGIISGMTGAGGNFGSGLT
Tomate T1-6             GTVAKDKFG----CGATFGIIPFISRRSLGIISGMTGAGGNFGSGLT
Tomate T1-7             GDVSKDKFS----CGATFGIIPFISRRSLGIISGMTGAGGNFGSGLT
                        *     *      *****   ** *** ****** ******** *
```

Fortsetzung Abb.13:

```
                                   12
Tabak-hi1           QLLFFTSSKYSTATGLTYMGMMIIGCTLPVTLCHFPQWGSM
Gerste-hi1          QLLFFTSSQYSTGRGLEYMGIMTIGLTLPVALVHFPQWGSM 72% (161)
Arabidopsis-hi1     QLLFFSTSHFTTEQGLTWMGVMIVACTLPVTLVHFPQWGSM 76% (161)
Arabidopsis-hi2     QLVFFSTSRFTTEEGLTWMGVMIVACTLPVTLIHFPQWGSM 76% (153)
Arabidopsis A3-1    QLLFFSSSRFSTAEGLSLMGVMAVACSLPVAFIHFPQWGSM 70% (124)
Arabidopsis A3-29   QLVFFSTSRFTTEEGLTWMGVMIVACTLPVTLIHFPQWGSM 76% (150)
Tomate-hi1          QLLFFTSSKYSTATGLTYMGFMIIGCTLPVTFCHFPQWGSM 93% (161)
Tomate-hi2          QLLFFTSSKYSTATGLTYMGFMIIGCTLPVTFCHFPQWGSM 93% (161)
Tomate T1-6         QLLFFTSSKYSTATGLTYMGFMIIGCTLPVTFCHFPQWGSM 93% (161)
Tomate T1-7         QLLFFTSTKYSTGTGLTYMGMMIIACTLPVMLVHFPQWGSM 92% (161)
                    ** **      *  **  ** *     ***
```

Legende zu Abb.13: Identische Aminosäuren in allen verglichenen Sequenzen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die zur Synthese der Primer verwendeten Aminosäuren sind durch Kursivdruck hervorgehoben. In diesen Bereichen muß die aus der Nukleotidsequenz des PCR-Produktes abgeleitete Aminosäuresequenz nicht mit der tatsächlichen Sequenz des Proteins im Ausgangsorganismus (*Arabidopsis*, Tomate) übereinstimmen. Die bei den Klonen A3-1 und A3-29 auftretenden Lücken sind auf für diesen Bereich nicht vorhandene Sequenzdaten zurückzuführen. Die Markierung der Transmembranregionen (4,5,6 und 10,11,12) erfolgte nach Trueman et al. (1996). Die Aminosäureidentitäten im Vergleich zu *Tabak-hi1* sind hinter den jeweiligen Sequenzen mit der Anzahl der zum Vergleich herangezogenen Aminosäuren (in Klammern), angegeben. Die Genbank-Zugangsnummern der aufgeführten Sequenzen lauten für *Arabidopsis-hi1*: AF019748; *Arabidopsis-hi2*: AF019749; *Gerste-hi1*: U34198; *Tabak-hi1*: Y08210; *Tomate-hi1*: AF092655; *Tomate-hi2*: AF092654.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Mitglieder der high-affinity Nitrattransporter-Familie zeigt auch deutlich, daß zwei Bereiche der Proteine klare Homologien zueinander aufweisen. In Abbildung 14 ist beispielhaft ein Aminosäuresequenzvergleich zwischen der Region mit den Transmembrandomänen No. 3, 4 und 5 mit dem Bereich der Transmembrandomänen No. 9, 10 und 11 von *Tomate-hi1* dargestellt. Der Bereich mit den Transmembrandomänen No. 3, 4 und 5 besitzt etwa 30% Sequenzidentität und etwa 50% Sequenzähnlichkeit zu dem Bereich der Transmembrandomänen No. 9, 10 und 11. Eine hohe Sequenzhomologie innerhalb von Proteinen („internal repeat") deutet auf eine Genduplikation bzw. Duplikation einer Protein-Domäne als Ursache einer solchen Sequenzwiederholung hin.

Das nach Klonierung sequenzierte 544 bp PCR-Produkt, das mit dem Primerpaar PFL1/PFL2 erhalten werden konnte (Abbildung 11), wurde mit 100% Übereinstimmung als Segment des Nitratreduktasegens aus Tomate (Daniel-Vedele et al., 1989) identifiziert (Tab.8).

Bei dem klonierten 533 bp großen PCR-Produkt, das mit dem Primerpaar TNiRF2/TNiRR1 erhalten wurde (Abbildung 12), handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Segment eines Nitritreduktasegens aus Tomate. Nach Translation der DNA-Sequenz des Plasmidinserts des Klons TNiR2-1 ergab sich eine über 94%ige AS-Identität zu einer Nitritreduktase aus *Nicotiana tabacum* (*nir1*). Die ermittelte DNA-Sequenz des Segmentes ist in Abbildung 15 dargestellt.

Abbildung 14:
Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Bereiche von *Tomate-hi1*

```
                         9                          10
Tomate-hi1 GRLWVLWILQTLGGVFCVLWGRSNSLPLAVTFMILFSIGAQAACGATFGII
           G  +++ +      VFC+ +  S    +AV FMI FS+    +C   + +
Tomate-hi1 GCAFLIMLSA--PTVFCMSFVSSAGGYVAVRFMIGFSLATFVSC--QYWMS
                 3                           4

                            11
Tomate-hi1 PFISRRSLGIISGMTGAGGNFGSGLTQLL
               + ++++++G     GN G G TQL+     27% AS-Identität
Tomate-hi1 TMFNSQIIGLVNGTAAGWGNMGGGATQLI     50% AS-Homologie
                          5
```

Legende zu Abb.14: Darstellung von Sequenzhomologien innerhalb eines Mitglieds der high-affinity Nitrattransporter-Familie (*Tomate-hi1*) zwischen der Region mit den Transmembrandomänen No. 3, 4 und 5 mit der Region mit den Transmembrandomänen 9, 10 und 11. Ähnliche Aminosäuren sind durch Kreuze markiert. Die Bezeichnung und Position der Transmembranregionen erfolgte nach Trueman et al. (1996). Die Aminosäureidentitäten und -homologien der beiden Bereiche sind hinter den AS-Sequenzen angegeben. Die Genbank-Zugangsnummer der aufgeführten Sequenz (*Tomate-hi1*) lautet: AF092655.

Abbildung 15: Nukleotidsequenz des PCR-Produktes aus einem putativen Nitritreduktasegen von Tomate

```
CAGAAATGTC  GGATGATGTG  GTTGATCGAT  GAACTGGGTG  TAGAAGGATT  CAGGGCAGAG
GTCGTAAAGA  GAATGCCTCA  GCAAGAGCTA  GAGAGAGCAT  CTCCGGAAGA  CTTGGTTCAG
AAACAATGGG  AAAGAAGAGA  TTATCTTGGT  GTACATCCAC  AGAAACAGGA  AGGCTATAGC
TTTATTGGTC  TTCACATTCC  AGTGGGTCGT  GTCCAAGCAG  ATGACATGGA  TGATCTAGCT
CGTTTGGCTG  ATGAGTACGG  GTCAGGAGAG  CTACGGCTGA  CTGTGGAACA  GAACATTATT
ATTCCCAACA  TTGAGAACTC  AAAGATTGAC  GCACTGCTAA  AAGAGCCTAT  TTTGAGCAAA
TTTTCACCTG  ATCCACCTAT  TCTCATGAAA  GGTTTAGTGG  CTTGTACTGG  TAACCAGTTT
TGTGGACAAG  CCATTATGAA  AACGAAAGCT  CGTTCCCTGA  AGATCACCGA  AGAGGTTCAA
AGGCAAGTAT  CTCTAACGAG  GCCAGTAAGG  ATGCACTGGA  CGGGCTGCCC  GAA
```

Legende zu Abb.15:
Die Primersequenzen sind in Fettdruck hervorgehoben. Die zur Amplifizierung verwendeten PCR-Bedingungen sind in Abschnitt 3.1.4.3 dargestellt.

Für einen Vergleich auf Aminosäureebene wurden NiR-Sequenzen von *Nicotiana tabacum* (nir-1), *Zea mays* (Mais) und *Spinacia oleracea* (Spinat) (Kronenberger et al., 1993) zur Gegenüberstellung der nach Translation erhaltenen AS-Sequenz aus Tomate (TNiR2-1) ausgewählt. Dabei ergeben sich AS-Identitäten von 68-94 %, wie in Abbildung 16 dargestellt.

Abbildung 16: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener NiR-Segmente

```
Tabak nir-1 QKCRMMWLIDELGVEGFRAEVEKRMPQQELERASPEDLVQKQWERRDYLG
Mais        QKTRMMWLIDELGMEVFRSEVEKRMPNGVLERAAPEDLVDKRWERRDYLG
Spinat      QKCRMMWLIDELGMEAFRGEVEKRMPEQVLERASSEELVQKDWERREYLG
TNir2-1     QKCRMMWLIDELGVEGFRAEVVKRMPQQELERASPEDLVQKQWERRDYLG
                   ****** * ** ** ****   ****  * ** * **** ***

Tabak nir-1 VHPQKQEGYSFIGLHIPVGRVQADDMDELARLADEYGSGEIRLTVEQNII
Mais        VHPQKQEGLSYVGLHVPVGRLQAADMFELARLADEYGTGELRLTVEQNIV
Spinat      VHPQKQQGLSFVGLHIPVGRLQADEMEELARIADVYGSGELRLTVEQNII
TNir2-1     VHPQKQEGYSFIGLHIPVGRVQADDMDDLARLADEYGSGELRLTVEQNII
            ****** * *  *** **** **  *  ****** ** ***********

Tabak nir-1 IPNIENSKIEALLKEPVLS--TFSPDPPILMKGLVACTGNQFCGQAIIET
Mais        LPNVSNERLDALLAEPLLQEQRLSPRPSMLLRGLVACTGNQFCGQAIIET
Spinat      IPNVENSKIDSLLNEPLLKE-RYSPEPPILMKGLVACTGSQFCGQAIIET
TNir2-1     IPNIENSKIDALLKEPILS--KFSPDPPILMKGLVACTGNQFCGQAIMET
             **           ** *     ** *     ******* ******* **

Tabak nir-1 KARSLMITEEVQRQVSLTRPVRMHWTGCP  (94%)
Mais        KARALQVAREVEKRVAVPRPVRMHWTGCP  (68%)
Spinat      KARALKVTEEVQRLVSVTRPVRMHWTGCP  (79%)
TNir2-1     KARSLKITEEVQRQVSLTRPVRMHWTGCP
            *** *    **   *   ****
```

Legende zu Abb.16: Identische Aminosäuren in allen verglichenen Sequenzen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Aminosäureidentität im Vergleich zu Klon TNiR2-1 ist in Klammern hinter den jeweiligen Sequenzen angegeben. Die zur Synthese der Primer verwendeten Aminosäuren sind durch Fettdruck hervorgehoben. In diesen Bereichen muß die aus der Nukleotidsequenz des PCR-Produktes abgeleitete Aminosäuresequenz nicht mit der tatsächlichen Sequenz des Proteins im Ausgangsorganismus (Tomate) übereinstimmen. Die Sequenzen von *Nicotiana tabacum* (Tabak nir-1), *Zea mays* (Mais; M23456), *Spinacia oleracea* (Spinat; X07568) sind der Literatur entnommen (Back et al., 1988; Kronenberger et al., 1993; Lahners et al., 1988;).

3.1.6 Entwicklung von Sonden unter Verwendung des 3´-RACE-Verfahrens zur Analyse der Expression von pflanzlichen Nitrattransportergenen

Da *Arabidopsis* im Gegensatz zu Tomate nicht mykorrhizierbar ist, wurde Tomate als Versuchspflanze eingesetzt und resultierend als weitere Arbeitsgrundlage die aus Tomate erhaltenen Nitrattransporter-DNA-Sequenzen verwendet. Die beobachteten hohen Homologien der klonierten Teilsequenzen, sowohl innerhalb der Mitglieder der low-affinity wie auch innerhalb der high-affinity Nitrattransporter-Familie, könnten bei einer Expressionsanalyse durch starke Kreuzhybridisierung die Unterscheidung der Transkripte der unterschiedlichen Gene einer Nitrattransporterfamilie erschweren. Daher wurde unter Verwendung des RACE-Verfahrens (siehe Abschnitt 2.3.3.2) versucht, die am 3´-Ende der Gene gelegenen, transkribierten, aber nicht translatierten, weniger stark konservierten Bereiche der Nitrattransportergene zu klonieren. Diese Bereiche sollten dann als Sonden eingesetzt

werden und in Hybridisierungsexperimenten die Unterscheidung von Transkripten verschiedener Mitglieder einer Nitrattransporterfamilie ermöglichen.

3.1.6.1 Auswahl geeigneter Sequenzbereiche zur Herstellung von Primern für low- und high-affinity Nitrattransportergene zur Durchführung von 3´-RACE-Experimenten

Die beiden Klone T1-6 und T1-7 weisen, wie auch die Sequenzen der low-affinity Nitrattransporter *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2* (Lauter et al., 1996) untereinander, auf DNA-Ebene eine Sequenzübereinstimmung von über 80% auf. Nur wenige Bereiche unterscheiden sich stärker voneinander. Entscheidend für die Auswahl genspezifischer Primer sind Sequenzbereiche, in denen sich Tripletts nicht nur in der dritten Base unterscheiden, sondern über mindestens drei Basen unterschiedlich sind. Diese Bereiche können dann als 3´-gelegene Basen der Primer eine spezifische Amplifizierung des gewünschten Segmentes ermöglichen. Ein solcher Bereich ist innerhalb der letzten fünf Basenpaare vor der Bindungsstelle des Primers PNT4 innerhalb der Sequenzen T1-6 und T1-7 vorhanden. Dieser wurde zur Synthese von Oligonukleotidprimern (PNT5-6 und PNT5-7) eingesetzt (Abbildung 17). Ebenso diente ein Sequenzbereich der low-affinity-Nitrattransportergene *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2*, der vier unmittelbar aufeinander folgende unterschiedliche Basenpaare auf-weist, als Grundlage zur Synthese der Oligonukleotidprimer PNT2A und PNT2B (Abb.17)

Abbildung 17:

PNT5-7

T1-7 ATGATCATCG**CG**TG**T**AC**A**CTTCC**A**GT**A**A**TG**TT**AGT**T-PNT4
T1-6 ATGATCATAG**GA**TG**C**AC**T**CTTCC**T**GT**T**A**CA**TT**TTG**T-PNT4

PNT5-6

PNT2A

Tomate-lo1 ^{1644}GACAATTGTGCA**C**A**AA**GT**A**AC**G**GGG**GAT**AAAC**CATG**GTTA^{1683}
Tomate-lo2 ^{1693}TACAATTGTACA**T**A**TG**GT**T**AC**T**GGG**ACA**AAAC**ATCC**ATGG^{1720}

PNT2B

Legende zu Abbildung 17: Darstellung der zur Synthese der Primer PNT2A, PNT2B, PNT5-6 und PNT5-7 ausgewählten Nukleotidsequenzen. Die angegebenen hochgestellten Zahlen entsprechen den jeweiligen Positionen der Nukleotide in der cDNA-Sequenz von *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2* (Lauter et al., 1996; Genbank-Zugangsnummern: X92853 und X92852). Die einander nicht entsprechenden Nukleotide sind innerhalb der Primersequenz durch Fettdruck hervorgehoben.

3.1.6.2 3´-RACE-Experimente zur Amplifizierung von 3´-nicht-translatierten cDNA-Enden von Nitrattransportergenen von Tomate

Zur Herstellung von cDNA als Grundlage für die RACE-Experimente wurde Wurzel-Gesamt-RNA einer 8 Wochen alten Tomatenpflanze eingesetzt, deren Wurzeln zuvor für 12h in einer nahezu stickstofffreien 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) und anschließend 5 h in 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) mit 7,5 mM Nitrat inkubiert worden war. Diese Behandlung sollte die Isolierung von Nitrattransporter-cDNA-Sequenzen erleichtern, da in anderen Spezies die Nitratinduktion der Nitrataufnahme eine *De novo*-RNA-Synthese er-

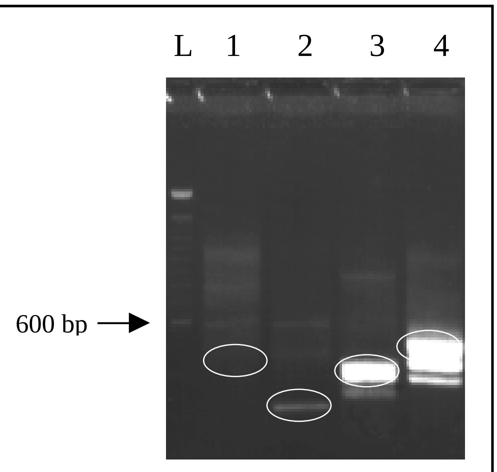
fordert (Jackson et al., 1973; Hole et al., 1990; Laine et al., 1995). In die Zweitstrangsynthese (siehe Abschnitt 2.3.3.2) wurden in Kombination mit den Primern RACE1/RACE2, die degenerierten Primer PNT1, zur Amplifizierung von low-affinity-, und PNT3, zur Amplifizierung von high-affinity-Nitrattransporter-cDNA eingesetzt. In der Drittstrangsynthese-PCR konnten mit den genspezifischen Primern PNT2A, PNT2B, PNT5-6 und PNT5-7 spezifische Amplifikationsprodukte erhalten werden (Abb.18), die nach Gelelution kloniert wurden. Der erhaltene RACE-Klon PNT2A-6 (470bp-Insert) entspricht bis auf vier unterschiedliche Basen in der Nukleotidsequenz am äußersten 3´-Ende der nichttranslatierten Region dem erwarteten Teilbereich des low-affinity Nitrattransportergens *Tomate-lo1*. Bei dem mit dem Primer PNT2B erhaltenen Amplifikat von etwa 300 bp Länge handelt es sich bei einer erwarteten Amplifikatgröße von etwa 450 bp um das verkürzte 3´-Ende des low-affinity Nitrattransportergens *Tomate-lo2* (RACE-Klon PNT2B-2). Über einen Bereich von 258 Nukleotiden stimmt die Sequenz des Inserts zu 100% mit dem entsprechenden Bereich von *Tomate-lo2* überein. Die reduzierte Amplifikatgröße läßt sich vermutlich auf eine bevorzugte Bindung von RACE1 während der Erststrangsynthese an einen Adenosin-reichen Bereich etwa 130 bp vor dem eigentlichen poly-A-Schwanz erklären.

Abbildung 18: RACE-Drittstrangsynthese

Zur Isolierung von genspezifischen Sonden wurden die Amplifikationsprodukte der Zweitstrangsynthesen 1:100 verdünnt und in die Drittstrang-PCR-Reaktionen eingesetzt. Die PCR-Methode bestand aus 40 Zyklen mit einer Primerbindungstemperatur von 60°C. Je 8 µl der PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt. Als Längenstandard wurde eine 100 bp-Leiter (Gibco) aufgetragen.

Spur L: Längenstandard
Spur 1: Zweitstrang mit PNT1 → PNT2A/RACE3
Spur 2: Zweitstrang mit PNT1 → PNT2B/RACE3
Spur 3: Zweitstrang mit PNT3 → PNT5-6/RACE3
Spur 4: Zweitstrang mit PNT3 → PNT5-7/RACE3

Die zur Klonierung aus dem Gel eluierten Bereiche sind weiß umrandet dargestellt.



Mit dem Primer PNT5-6, der im 3´-RACE die spezifische Amplifizierung der 3´-Enden der high-affinity Nitrattransportergene *Tomate-hi1* oder *Tomate-hi2* ermöglichen sollte, konnte ein Amplifikat von 440 bp Länge erhalten werden, das abzüglich der Primerse-quenzen über einen Bereich von 399 bp der Nukleotidsequenz des entsprechenden Be-reiches von *Tomate-hi2* entspricht. Ein PCR-Produkt, das der Sequenz von *Tomate-hi1* ent-sprach, konnte nicht kloniert werden. Die Übereinstimmung der Sequenzen, gerade auch im 3´-nicht-translatierten Bereich, legt die Identität des RACE-Klones PNT5.6-1 als um etwa 50 Nukleotide verkürztes 3´-Ende der *Tomate-hi2*-cDNA nahe. Die Drittstrangsyn-these mit dem Primer PNT5-7 führte zur Amplifizierung eines Gensegmentes von 500 bp-Länge. Klonierung und Sequenzierung dieses PCR-Produktes ergaben, daß auch hier ein von *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* verschiedenes Gensegment erhalten wurde (RACE-Klon

PNT5.7-1). Innerhalb des mutmaßlich translatierten Bereiches (siehe Abb. 19) besteht zu *Tomate-hi2* eine Sequenzidentität von 77% auf Nukleotid- und 86% auf Aminosäureebene. Die 3´-nichttranslatierten Bereiche unterscheiden sich erheblich voneinander. So ergibt sich über einen Bereich von 220 bp eine nur etwa 30%ige Sequenzidentität zwischen *Tomate-hi2* und PNT5.7-1 (Abb.19). Aufgrund der hohen Homologien zu anderen high-affinity Nitrattransportergenen wird das zur Sequenz PNT5.7-1 gehörige Gen als drittes putatives high-affinity Nitrattransportergen in Tomate angesehen und im weiteren als *Tomate-hi3* bezeichnet.

Die Klonierung der vier unterschiedlichen Nitrattransportergensegmente (PNT5.7-1, PNT5.6-1, PNT2A-6, PNT2B-2) aus Tomatenwurzel-cDNA zeigt, daß unter den gegebenen Bedingungen gleichzeitig mindestens vier unterschiedliche Nitrattransportergene in den Wurzeln von Tomate transkribiert werden.

Bei *Tomate-hi3* und *Arabidopsis-hi2* ist eine putative Serin-Phosphorylierungsstelle am mutmaßlichen C-Terminus des Proteins, die bei anderen high-affinity Nitrattransportern konserviert ist (Amarasinghe et al., 1998), durch Threonin ersetzt. *Tomate-hi3* besitzt demnach wie die anderen Mitglieder der IIIb-Subgruppe der high-affinity Nitrattransporter-Familie (Forde, 2000) in einem Abstand von neun AS zwei mutmaßliche Phosphorylierungsstellen der Protein-Kinase C am C-Terminus des Proteins (siehe Abb.19)

Abbildung 19:

```
Tomate-hi2  GGATGCACTCTTCCTGTTACATTTTGTCATTTCCCACAATGGGGAAGCATGTT
PNT5.6-1    GGATGCACTCTTCCTGTTACATTTTGTCATTTCCCACAATGGGGAAGCATGTT
PNT5.7-1    GCGTGTACACTTCCAGTAATGTTAGTTCATTTCCCACAGTGGGGTAGTATGTT
            *  ** ** ***** ** *  **   ************ *****  * *****

Tomate-hi2  TCTCCCACCAACAAAAGATCCAGTCAAGGGAACGGAAGAACATTATTATACTT
PNT5.6-1    TCTCCCACCAACAAAAGATCCAGTCAAGGGAACGGAAGAACATTATTATACTT
PNT5.7-1    TTTGCCTCCATCTAAAGATCCTATTAAGGGTACTGAAGAACATTATTTTGGTT
            * * ** *** * ********  * ***** ** ************* *  **

Tomate-hi2  CAGAGTACACAGAGGCAGAGAGGCAAAAAGGGATGCACCAAAACAGCTTGAAA
PNT5.6-1    CAGAGTACACAGAGGCAGAGAGGCAAAAAGGGATGCACCAAAACAGCTTGAAA
PNT5.7-1    CTGAGTATACTGAGGATGAGAAACAAAAGGGAATGCACCAGAACAGCATCAAG
            ***** ** ****  ****  ***** ** ******** ****** * **

Tomate-hi2  TTCGCTGAAAATTGCCGATCGGAGCGTGGTAA...GCGCGTTGGTTCCGCACC
PNT5.6-1    TTCGCTGAAAATTGCCGATCGGAGCGTGGTAA...GCGCGTTGGTTCCGCACC
PNT5.7-1    TTCGCGGAAAACAGCAGGACAGAGCGTGGGAAGAAGCGCGTTGGTTCAGCACC
            ***** *****  ** *  * ******** **   ************ *****

Tomate-hi2  CACTCCACCAAATTTGACACCAAACCGTGTCTGATCGGATTGATGATCGTCAA
PNT5.6-1    CACTCCACCAAGTTTGACACCAAACCGTGTCTGATCGGATTGATGATCGTCAA
PNT5.7-1    TACTCCGCCTAATGTAACACCAAATCGCGTCTGATGGGGAAAAAATTAAAATA
             ***** ** * * * ******** ** ******* **        *     *

Tomate-hi2  TCTTTAGTTCAATGAGCTGAGTTGTTTCAATAAGCAAAATAAGTCTGCATTTT
PNT5.6-1    TCTTTAGTTCAATGAGCTGAGTTGTTTCAATAAGCAAAATAAGTCTGCATTTT
PNT5.7-1    CTTACTCCGCAGTTCATGCTCGTATAACATAAAATAAAGAGTGATATATGTAT
              *      ** *         * *  **  **  ***    *       * *
```

Fortsetzung Abb.19:

```
Tomate-hi2  TTTTTCTTCTTTCTTTTTTGTTTTTTTCTTAAATGATGTTGCTTGTCAATACG
PNT5.6-1    TTTTTCTTCTTTCTTTTTTGTTTTTTTCTTAAATGATGTTGCTTGTCAATACG
PNT5.7-1    GCCTTTTCGTTTGAATGAGTTGATTTACCGAAGTGTAGTCTTTCCTTTTCGGG
               ** *  ***   *    *  *** *  ** **  **   *  *      *

Tomate-hi2  CTGGAATCTACTAAGGTGTATGTGGTTTTAAATTTACGTATATATAATATATA
PNT5.6-1    CTGGAATCTACTAAGGTGTATGTGGTTTTAAA-RACE1/RACE3
PNT5.7-1    GAATCTGAACTTTCATTTTGTCGATGAATGTTGGATTCCCATTTGTAATCACT
                       *    * *      * **  **   *    **     *

Tomate-hi2  TATATATATATATTACACATTTTAATGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA
PNT5.6-1
PNT5.7-1    TCCTCATAACCCCAAATCTGAAAAAAAGAAGAAGGTGATTCCCTAAAAAAAAA
                   *      *        **      *    *      ****

PNT5.7-1    AAAAAAA-RACE3
```

AS-Sequenzvergleich:

```
PNT5.6-1    GCTLPVTFCHFPQWGSMFLPPTKDPVKGTEEHYYTSEYTEAERQ
PNT5.7-1    ACTLPVMLVHFPQWGSMFLPPTKDPIKGTEEHYFGSEYTEDERQ
Tabak-hi1   GCTLPVTLCHFPQWGSMFFPPTKDPVKGSEEHYYAAEYTEAERQ
Soja-hi1    ACTLPVSVVHFPQWGSMFFPPSKDVSKSTEEFYYTSEWNEEEKQ
             *****   ********* ** **  * *** *   *  * * *


PNT5.6-1    KGMHQNSLKFAENCRSERGK-RVGSAPTPPNLTPNRV[Stop]
PNT5.7-1    KGMHQNSIKFAEKSRTERGKKRVGSAPTPPNVTPNRV[Stop]
Tabak-hi1   KGMHQNSLKFAENCRSERGK-RVGSAPTPPNLTPNRV[Stop]
Soja-hi1    KGLHQQSLKFAENSRSERGK-RVASAPTPPNATPTHV[Stop]
            ** ** * ***** * **** ** ******* **  *
```

Legende zu Abbildung 19: Vergleich der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der erhaltenen RACE-Klone PNT5.6-1 und PNT5.7-1 mit *Tomate-hi2* (Nukleotide 1401 bis 1870; AF092654), *Tabak-hi1* (Y08210) und *Soja-hi1* (AF047718). Identische Nukleotide und Aminosäuren in allen verglichenen Sequenzen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Positionen mutmaßlicher Protein-Kinase C Phosphorylierungsstellen sind rot unterlegt. Stop-Codons sind im Nukleotidsequenzvergleich durch Fettdruck hervorgehoben. Die Primersequenzen PNT5-7 und PNT5-6 und die von diesen abgeleiteten Aminosäuren sind durch Kursivdruck hervorgehoben. In diesen Bereichen muß die Nukleotidsequenz und die aus der Nukleotidsequenz des PCR-Produktes abgeleitete Aminosäuresequenz nicht mit der tatsächlichen Sequenz im Ausgangsorganismus (Tomate) übereinstimmen.
Markierungen DNA-Sequenzen:
Rote Markierung: Primerbindungsstelle THAT1 und komplementär RTHAT1A
Grüne Markierung: Primerbindungsstelle THAT2 und komplementär RTHAT2A
Blaue Markierung : Primerbindungsstelle RTHAT2B
Rosafarbene Markierung: Primerbindungsstelle RTHAT1B

Das durch die RACE-Primer bedingte Vorhandensein von poly-A-Bereichen am 3´-Ende der RACE-Inserts kann zu Problemen bei der RNA-RNA-Hybridisierung führen (Krapp et al, 1998). Durch Amplifizierung mit spezifischen reversen Primern, die kurz vor den 3´-Enden der Inserts komplementäre Bindungsstellen aufweisen (LEMIT1, LENIT2, RTHAT1B und RTHAT2B), konnten um die poly-A-Regionen verkürzte Inserts erhalten werden (Abb.20). Nach Klonierung der RACE-PCR-Produkte in den Vektor pGEM®-T Easy (Promega) wurden die erhaltenen Klone zur Herstellung von Hybridisierungssonden verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 9:

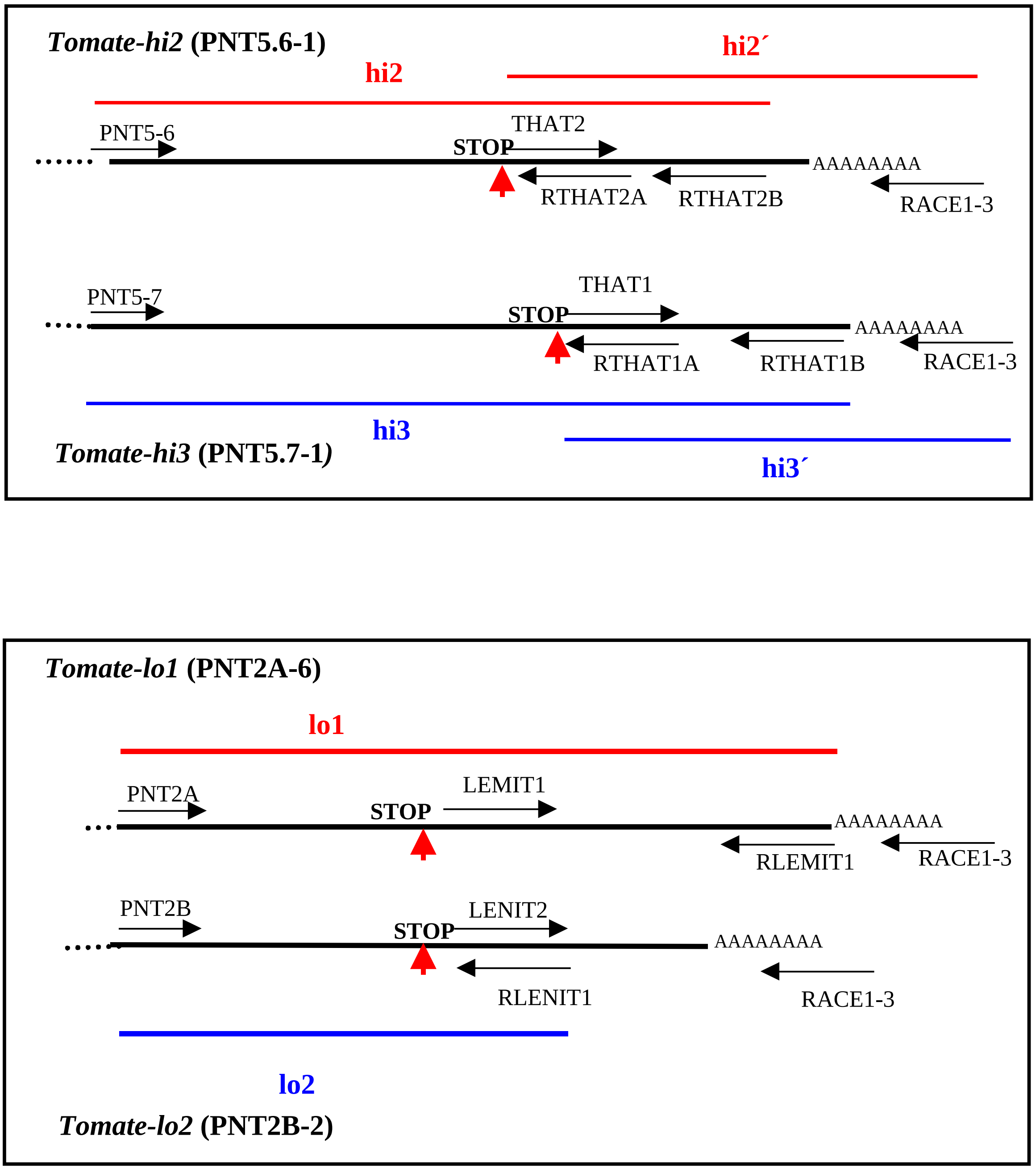
Hybridisierungs-sonde	amplifiziert aus	Primerpaar	Länge (bp)	Segment aus
lo1	PNT2A-6	PNT2A/RLEMIT1	432	*Tomate-lo1*
lo2	PNT2B-2	PNT2B/RLENIT1	231	*Tomate-lo2*
hi2	PNT5.6-1	PNT5-6/RTHAT2B	374	*Tomate hi2*
hi2´	PNT5.6-1	THAT2/RTHAT2B	133	*Tomate hi2*
hi3	PNT5.7-1	PNT5-7/RTHAT1B	431	*Tomate-hi3*
hi3´	PNT5.7-1	THAT1/RTHAT1B	163	*Tomate-hi3*

Legende zu Tabelle 9: Zusammenfassung der Eigenschaften der im weiteren eingesetzten Hybridisierungssonden, die mit Hilfe der aufgeführten Primerkombinationen durch PCR-Amplifizierung aus den klonierten RACE-Produkten gewonnen wurden.

3.1.6.3 RT-PCR-Nachweis: T1-7 und PNT5.7-1 sind Bestandteile von *Tomate-hi3*

Die zur Amplifizierung von PNT5.7-1 verwendete Primersequenz stammte aus der Sequenz des Klons T1-7. Somit lag die Vermutung nahe, es könnte sich bei beiden Insertsequenzen um Bestandteile des gleichen Gens, nämlich von *Tomate-hi3*, handeln. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Wie in Abbildung 21A zu erkennen ist, konnte aus der cDNA von Tomatenwurzeln mit den Primern PNT3 und RTHAT1A ein etwa 1,15 kb großes PCR-Produkt erhalten werden, das der erwarteten Größe eines cDNA-Amplifikates (d.h. ohne Introns) aus *Tomate-hi3* entspricht. Dieses PCR-Produkt wurde nun in weitere PCR-Reaktionen eingesetzt. Mit dem für *Tomate-hi2* spezifischen Primer PNT5-6 in Kombination mit RTHAT1A konnte im Gegensatz zur für *Tomate-hi3* spezifischen Primerkombination PNT5-7/RTHAT1A kein PCR-Produkt der erwarteten Größe erhalten werden (Abb. 21B). Mit diesen Experimenten konnte somit klar bestätigt werden, daß T1-7 und PNT5.7-1 Bestandteil von *Tomate-hi3* sind.

Abbildung 20:



Legende zu Abb.20: Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen des 3´-terminalen Bereiches der cDNA der Nitrattransportertranskripte von *Tomate-hi2*, *Tomate-hi3*, *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2* (schwarze Linien). Die farbig dargestellten Bestandteile markieren die zur Herstellung von Hybridisierungssonden verwendeten Bereiche. Die ungefähre Position der Stop-Codons ist durch einen roten Pfeil sowie mit der Beschriftung **STOP** markiert.

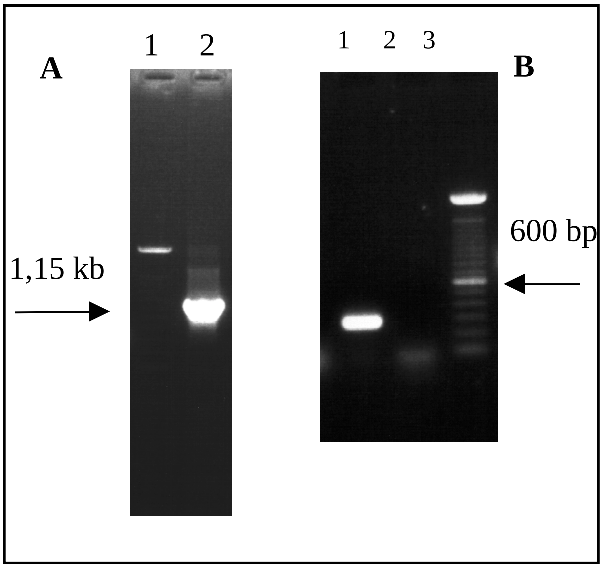
Abbildung 21:

A: PCR-Experiment mit dem Primerpaar PNT3/RTHAT1A mit cDNA aus mykorrhizierten Tomatenwurzeln:
1: 100 bp-Leiter, Gibco
2: 2 µl cDNA

B: PCR-Experiment mit jeweils 1 µl 1:250 verdünntem PCR-Produkt aus Abb. 21A:

1. PNT5-7/RTHAT1A
2. PNT5-6/RTHAT1A
3. 100 bp-Leiter, Gibco

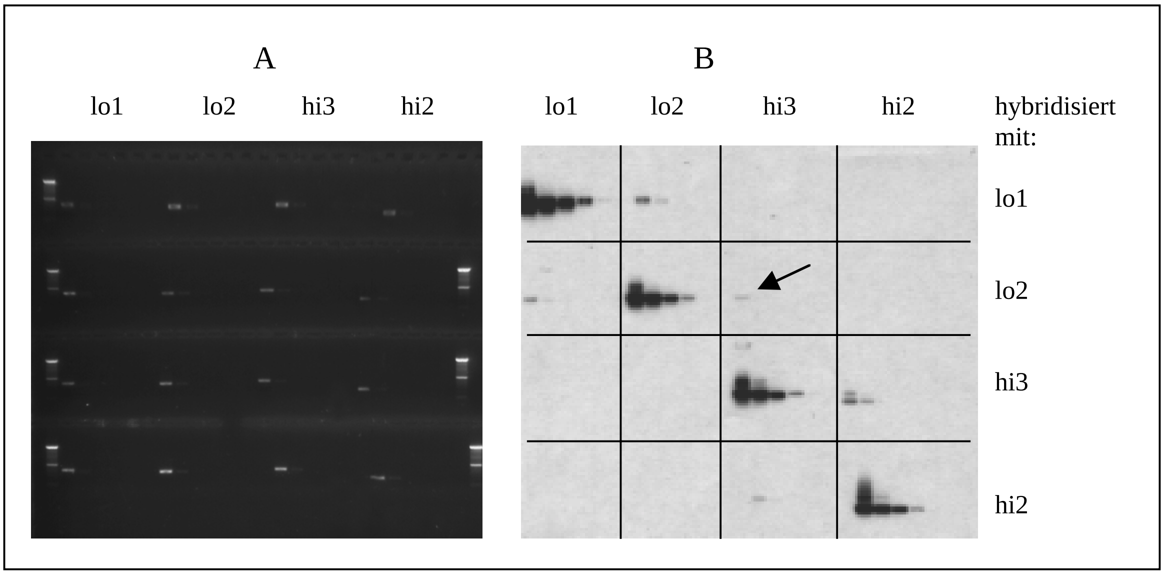
Die PCR-Methode bestand aus 40 Zyklen mit einer Primerbindungstemperatur von 50°C.



3.2 Kreuzhybridisierung zwischen den unterschiedlichen RACE-Produkten

Die klonierten Segmente sollten als Gensonden eingesetzt werden, um die Expression von Nitrattransportergenen von Tomate in der Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* zu untersuchen. Wesentliche Voraussetzung hierfür ist jedoch, daß zwischen den unterschiedlichen Nitrattransporter-Sonden keine Kreuzhybridisierung auftritt bzw. diese erheblich schwächer ist als eine homologe Hybridisierung. Auf einem Agarosegel (Abb.22) wurden in absteigender Konzentration PCR-Produkte der jeweiligen Gensegmente aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde die DNA mit den unterschiedlichen mit Digoxigenin markierten DNA-Sonden hybridisiert (Abb.22). Durch unmittelbaren optischen Vergleich der Signalstärken in direktem Bezug zu den eingesetzten DNA-Konzentrationen kann man in Abbildung 22 erkennen, daß die homologe Hybridisierung der Sonden jeweils mindestens um den Faktor 10^3 stärker ist als bei Verwendung von heterologen Sonden. Eine Kreuzhybridisierung zwischen den Segmenten aus high- und low-affinity-Nitrattransportergenen tritt nur im Falle der Hybridisierung von hi3 mit der Sonde lo2 auf (Pfeil, Abb.22). Die Signalstärke der heterologen Hybridisierung liegt etwa um den Faktor 10^4 unter der des homologen Hybridisierungssignals. Die Spezifität der Sonden sollte demnach hoch genug sein, um eine Untersuchung der Expression einzelner Nitrattransportergene in mykorrhizierten Tomatenwurzeln zu ermöglichen.

Abbildung 22: Kreuzhybridisierung zwischen den Nitrattransportersonden lo1, lo2, hi2 und hi3



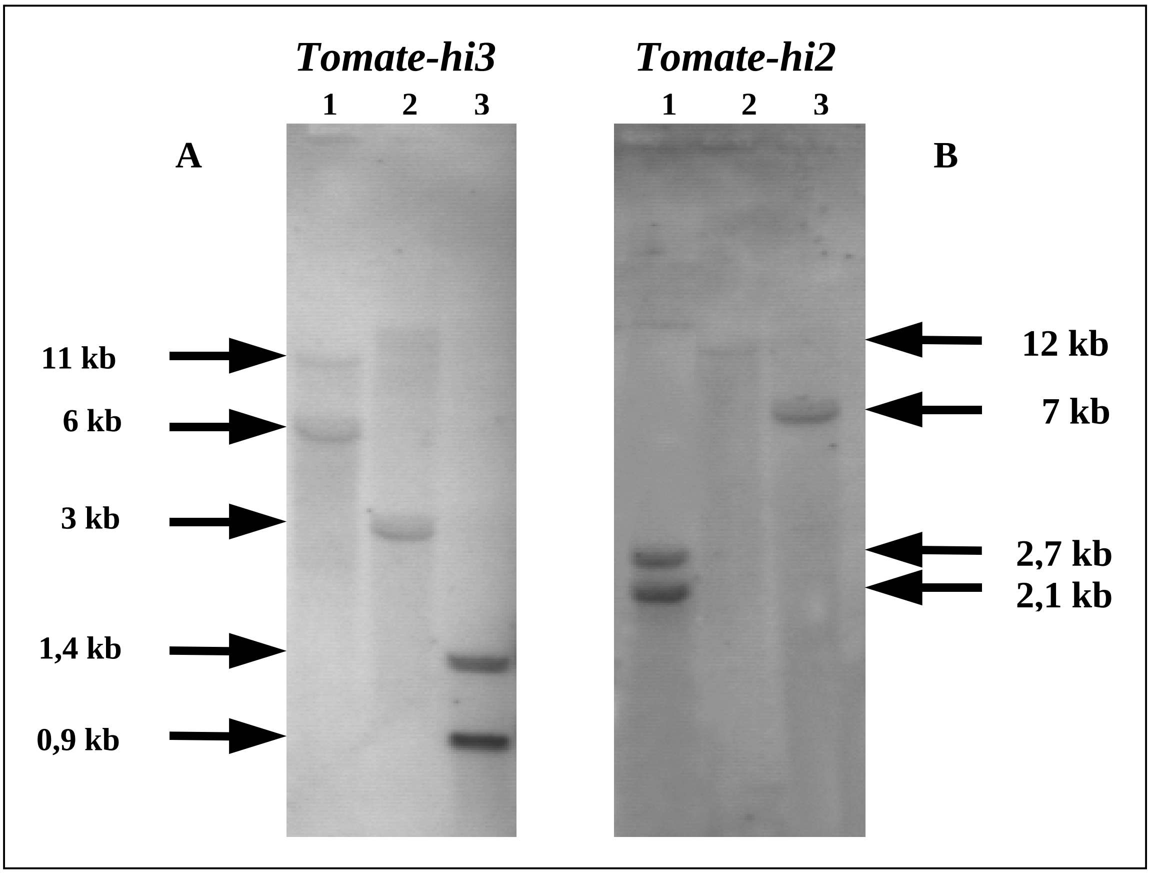
Legende zu Abb. 22:
Ein 1% Agarosegel mit jeweils vier Auftragungsreihen der PCR-Produkte hi3 (aus *Tomate-hi3*), hi2 (aus *Tomate-hi2*), lo1 (aus *Tomate-lo1*), lo2 (aus *Tomate-lo2*) mit je 100, 10, 1, 0,1, 0,01 und 0,001 ng DNA (v.l.n.r.) wurde auf einen Nylonfilter übertragen, dieser in vier Teile geteilt und ü.N. mit den am rechten Bildrand angegebenen mit Digoxigenin markierten DNA-Sonden (lo1, lo2, hi2, hi3) hybridisiert. Waschen und Färben der Filter erfolgte wie in Abschnitt 2.6.6 angegeben. Als Längenstandard wurde in jeder Reihe rechts und links außen eine 100bp-Leiter (Gibco) aufgetragen. Der Pfeil markiert die zwischen hi3 und lo2 auftretende Kreuzhybridisierung.

3.3 Resultate von Hybridisierungen zwischen PCR-Produkten klonierter high-affinity Nitrattransportergensegmente mit genomischer DNA aus Tomate

Zu Beginn der Untersuchungen zur Expression von low- und high-affinity-Nitrattransportergenen waren die beiden high-affinity-Nitrattransportersequenzen aus Tomate *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* (Ono et al., 2000) noch nicht publiziert. Ono et al. (2000) konnten durch Southern-Analysen zeigen, daß *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* vermutlich gekoppelt (d.h. in enger räumlicher Nähe) im Genom lokalisiert sind. Die von Ono et al. (2000) Hybridisierungsmuster waren für *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2*, bis auf Intensitätsunterschiede der Banden, nahezu identisch. Um nun *Tomate-hi3* mit *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* in einer Southern-Analyse zu vergleichen, wurde wie bei Ono et al. (2000) genomische DNA aus Tomate mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI, *Eco*RV und *Hin*dIII geschnitten. Nach Auftrennung im Agarosegel und Southern-Transfer auf Nylonfilter (Abschnitt 2.6.4.1) wurden Hybridisierungsexperimente unter stringenten Bedingungen zwischen genomischer DNA aus Tomate und den mit Digoxigenin markierten (Abschnitt 2.5.1) PCR-Produkten hi3 (*Tomate-hi3*) und hi2 (*Tomate-hi2*) durchgeführt.
Wie aus Abbildung 23 deutlich wird, treten in Spur 1 (*Eco*RI-Verdau) nach Hybridisierung mit der Sonde für *Tomate-hi2* Banden von 2,7 kb und 2,1 kb Länge auf. Im *Eco*RV-Verdau (Spur 2) ist eine etwas schwächere Signalbande bei 12 kb und in der Restriktion mit *Hin*dIII (Spur 3) eine kräftigere Bande bei 7 kb zu erkennen. Bei der Hybridisierung mit der Sonde für *Tomate-hi3* tritt ein Signalbandenmuster (Abb.23A) auf, das von dem bei

Hybridisierung mit hi2 erhaltenen Muster (Abb.23B) deutlich verschieden ist. Die Restriktion mit *Eco*RI führt zu Signalbanden bei 11 kb und 6 kb. Im *Eco*RV-Verdau ist ein deutliches Signal bei 3 kb und im *Hin*dIII-Verdau zwei Signale bei 1,4 kb und 0,9 kb zu erkennen.

Abbildung 23:



Legende zu Abb. 23:
Genomische DNA von Tomate (je 20 µg) wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI (Spur 1), *Eco*RV (Spur 2) und *Hin*dIII (Spur 3) 6 h bei 37°C geschnitten, auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und durch Southern-Transfer auf einen Nylonfilter übertragen. Filter A wurde ü.N. bei 42°C mit dem Dig-markierten PCR-Produkt hi3 (*Tomate-hi3*) und Filter B mit Produkt hi2 (*Tomate-hi2*) hybridisiert. Die weitere Behandlung der Filter erfolgte wie in Kapitel 2.6.6 angegeben.

3.4 Untersuchungen zur Expression von Nitrattransportergenen in Wurzeln und oberirdischen Pflanzenteilen von Tomate

Aus Blättern, Blüten, Früchten und Wurzeln von Tomatenpflanzen (siehe Kap. 2.1.7) wurde Gesamt-RNA isoliert. Damit wurden Northern-Hybridisierungen zwischen der isolierten Tomaten-Gesamt-RNA und RNA-Sonden der vorliegenden Gensegmente aus Nitrattransportergenhomologen sowie mit RNA-Sonden für das Tomaten-Nitratreduktasegen und für ein Tomaten-Nitritreduktasegen durchgeführt. RT-PCR-Experimente wurden durchgeführt, um auch geringe Transkriptmengen qualitativ nachweisen zu können. Durch *In situ*-RNA-Hybridisierungen wurde versucht, Transkripte von Nitrattransportergenen im Gewebe zu lokalisieren.

3.4.1 Untersuchungen zur Induzierbarkeit von Nitrattransportergenen in Tomate durch Nitrat

Kinetische Untersuchungen deuten darauf hin, daß Bestandteile der Nitrataufnahmesysteme höherer Pflanzen nitratinduzierbar sind (Clarkson, 1986; Glass, 1988). Zur Untersuchung der Induzierbarkeit von Nitrattransportergenen durch Nitratgabe wurden zwölf Wochen alte nicht-mykorrhizierte Tomatenpflanzen eingesetzt. Dieser Zeitpunkt in der Entwicklung von Tomatenpflanzen wurde gewählt, weil bei einem späteren Vergleich mit mykorrhizierten Pflanzen, die erst nach zehn bis zwölf Wochen eine über 70%ige Mykorrhizierung aufweisen, entwicklungsbedingte Unterschiede in der Expression von Genen so gering wie möglich gehalten werden sollten. Von Lee et al. (1986ab) konnte für Gerstenwurzeln gezeigt werden, daß sowohl Nitrateinstrom als auch Nitrat-Nettoaufnahme durch eine kurze Nitratmangelphase stimuliert werden. Daher wurden die in 0,5 x Hoagland-Lösung (pH 6,0) herangezogenen Pflanzen für fünf Tage in einer modifizierten, nahezu stickstofffreien 0,5 x Hoagland-Lösung (pH 6,0) (siehe Kapitel 2.1.6) gehalten (Padgett und Leonard, 1993). Im Anschluß wurden Pflanzen für 6 h in eine Schale mit nitrathaltiger (7,5 mM NO_3^-) 0,5 x Hoagland-Lösung (pH 6,0) überführt.
Nach Isolierung von Gesamt-RNA aus Blättern und Wurzeln wurden Northern-Analysen (RNA-RNA-Hybridisierungen) und *In situ*-RNA-Hybridisierungen durchgeführt. Wie in Abbildung 24 dargestellt, konnten für *Tomate-lo1* Transkripte mit einer Länge von etwa 2-2,2 kb erhalten werden. Die Länge der Transkripte von *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* beträgt etwa 1,8-1,9 kb. Nitrat- und Nitritreduktase-Transkripte konnten in der RNA aus Wurzeln und Blättern der in N-freier Nährlösung gehaltenen Pflanzen nicht nachgewiesen werden (nicht dokumentiert). Mit der für *Tomate-lo2* spezifischen Sonde wurden wiederholt nur sehr starke unspezifische Hintergrundsignale erhalten. Daher wurde diese Sonde zu weiteren Untersuchungen nicht eingesetzt.
Mit der Sonde für *Tomate-hi2* und mit der für *Tomate-hi3* spezifischen Sonde konnten in Northern-Analysen Transkripte bei mit nitrathaltiger Nährlösung versetzten Tomatenwurzeln nachgewiesen werden (Abb. 24A und 24B). In den in nahezu N-freier Nährlösung gehaltenen Tomatenpflanzen hingegen konnten keine Transkripte von *Tomate-hi3* nachgewiesen werden (Abbildung 24B). Im Gegensatz zu den Ergebnissen für *Tomate-hi3* wurde mit der für *Tomate-lo1* spezifischen Sonde auch mit der RNA aus in nahezu N-freier Nährlösung gehaltenen Tomatenwurzeln ein Hybridisierungssignal erhalten (Abb. 24C). Für *Tomate-lo1* ist jedoch ein deutlich schwächeres Signal auch mit der Blatt-Gesamt-RNA aus Tomatenpflanzen zu erkennen, die in Schalen mit nitrathaltiger Nährlösung überführt worden waren. In der Northern-Analyse mit der Sonde für *Tomate-hi3* wurden keine Signale mit Blatt-Gesamt-RNA detektiert. Die vorliegenden Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

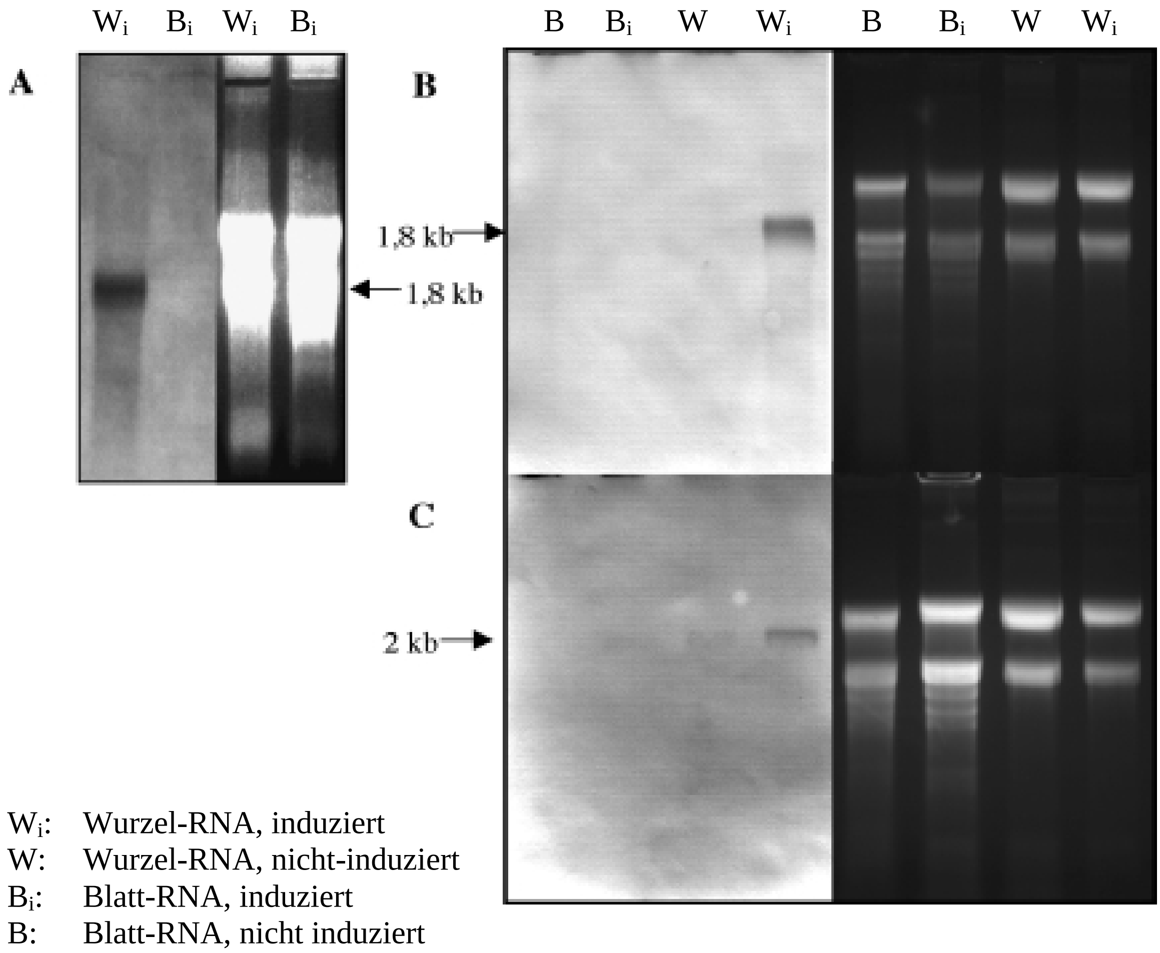
Tabelle 10: Ergebnisse der Northern-Analysen zur Induzierbarkeit von Nitrattransportergenen durch Nitratgabe

Gene	W	W_i	B	B_i
Tomate-lo1	+	++	-	+
Tomate-hi3	-	+++	-	-
Tomate-hi2	n.d.	+	n.d.	-

W: Wurzel-RNA, nicht-induziert
W_i: Wurzel-RNA, induziert
B: Blatt-RNA, nicht induziert
B_i: Blatt-RNA, induziert

+ = schwache Expression
++ = mäßige Expression
+++ = starke Expression
- = keine in der Northern-Analyse nachgewiesene Expression
n.d. = nicht durchgeführt

Abbildung 24: Induktion von Nitrattransportergenen in Blättern und Wurzeln von Tomatenpflanzen durch Nitrat



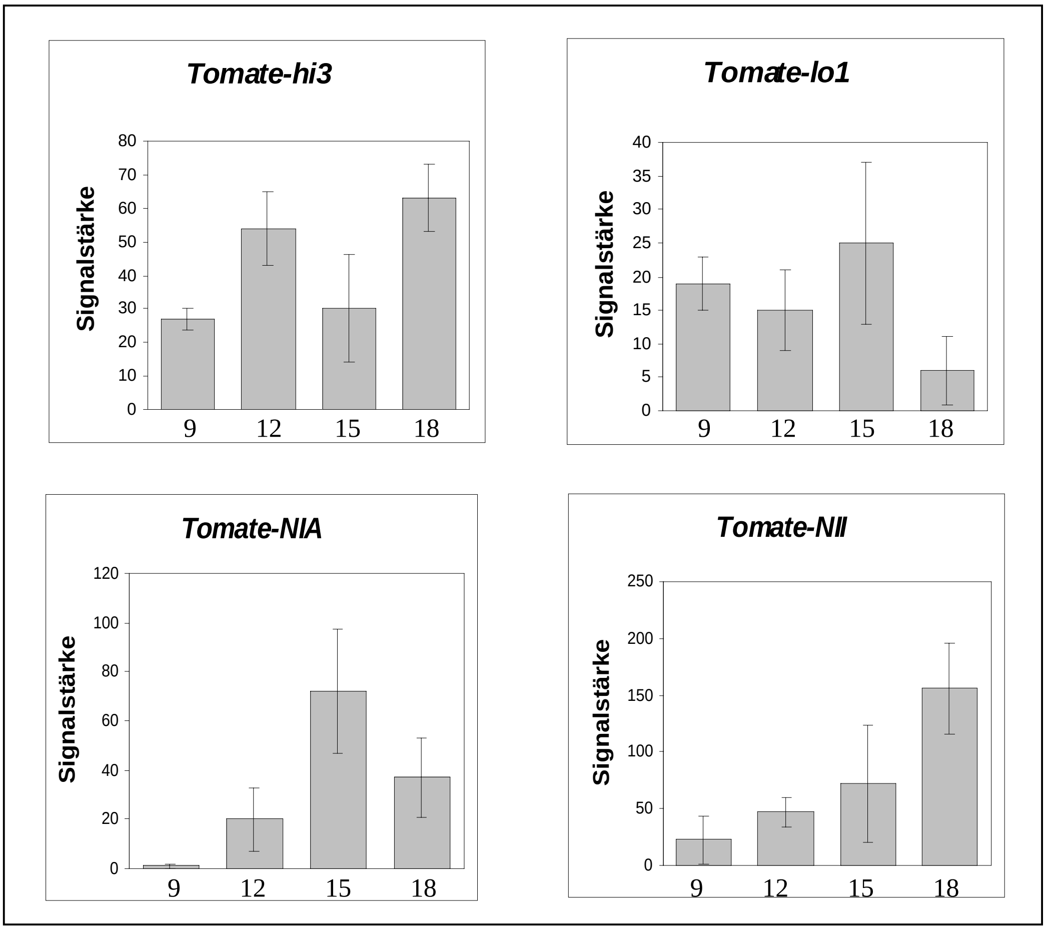
Legende zu Abbildung 24:
Aus Blättern und Wurzeln von zwölf Wochen alten Tomatenpflanzen wurde Gesamt-RNA isoliert. Die Pflanzen wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen vor der Ernte mit nahezu stickstofffreier 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) kultiviert. Ein Teil der Pflanzen wurde vor der Ernte für 6 h mit nitrathaltiger (7,5 mM NO_3^-) 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) versetzt. Pro Spur wurden 20 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Die RNA wurde durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf BiodyneB-Membran (Pall) transferiert. A: Hybridisierung mit einer RNA-Sonde aus *Tomate-hi2*. B: Hybridisierung mit einer RNA-Sonde aus *Tomate-hi3*. C: Hybridisierung mit RNA-Sonde aus *Tomate-lo1*. Die Detektion der Signale erfolgte kolorimetrisch.

3.4.2 Expression von low- und high-affinity Nitrattransportergenen in der Lichtphase im Tagesgang

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur sehr wenige Informationen zum zeitlichen Verlauf der Transkription von Nitrattransportergenen unter konstant gehaltenen Nährstoffbedingungen in der Nährlösung verfügbar. Von *Arabidopsis* war bekannt, daß es gegen Ende der Lichtphase zu einem Expressionsmaximum und nach Beginn der Dunkelphase zu einer erheblichen Abnahme der Transkriptmengen von high- und low-affinity Nitrattransportern kommt (Lejay et al., 1999). Daher wurde der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte

Versuch auf die Lichtphase beschränkt. Hierbei stand die Auswahl eines geeigneten Zeitpunktes zur vergleichenden Transkript-Analyse bei mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen im Vordergrund. Die Dokumentation einer detaillierten Kinetik war nicht Ziel des durchgeführten Versuchs. Je zwei fünfzehn Wochen alte, kontinuierlich in 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) gewachsene Tomatenpflanzen wurden innerhalb der Lichtphase (Lichtphase von 8.00 Uhr bis 20.00 Uhr; siehe Kapitel 2.1.6) zu vier verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Nach Isolierung von Gesamt-RNA wurden Northern-Analysen zur Untersuchung der Expression von *Tomate-lo1*, *Tomate-hi3*, *Tomate-NIA* (Nitratreduktasegen) und *Tomate-NII* (Nitritreduktasegen) in Tomatenwurzeln durchgeführt. In Abbildung 25 sind die erhaltenen Signalstärken verschiedener Zeitpunkte graphisch aufgetragen.

Abbildung 25: Transkriptmengenanalyse mit Gesamt-RNA aus Tomatenwurzeln im Verlauf der Lichtphase im Tagesgang



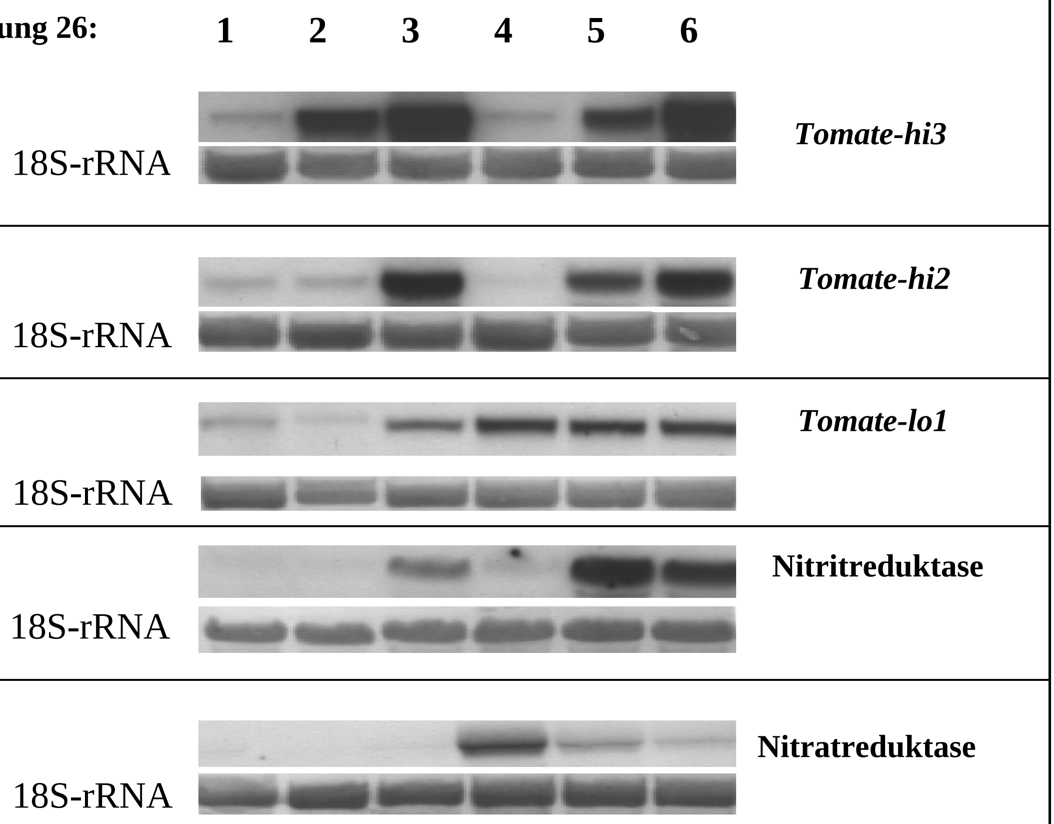
Legende zu Abbildung 25: Darstellung der Transkriptmengen von *Tomate-hi3*, *Tomate-lo1*, Nitratreduktase (*NIA*) und Nitritreduktase (*NII*) aus kontinuierlich in 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) gewachsenen Wurzeln von15 Wochen alten Tomatenpflanzen innerhalb der Lichtphase. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Die anschließende Hybridisierung mit den jeweiligen Antisense-RNA-Sonden erfolgte ü.N bei 68°C. Nach Chemilumineszenznachweis der spezifischen Transkripte erfolgte die Normalisierung durch Hybridisierung mit einer Sonde für die 18S-rRNA aus Tomate und anschließendem kolorimetrischem Nachweis. Die unterhalb der jeweiligen Balken angegebenen Zahlen entsprechen der Uhrzeit des jeweiligen Erntezeitpunktes. Die Fehlerbalken repräsentieren die beobachteten Varianzen der Signalstärken der untersuchten Pflanzen pro Erntezeitpunkt.

Bei der Nitritreduktase-Transkriptmenge läßt sich über den Tag eine deutliche Zunahme erkennen. Einen ähnlichen Verlauf weisen die Transkriptmengen des Nitratreduktasegens auf. Diese zeigen allerdings ein Maximum beim Meßpunkt um 15.00 Uhr. Für die Transkriptmenge des low-affinity Nitrattransportergens *Tomate-lo1* könnte ebenfalls ein Maximum bei dem 15.00 Uhr Meßpunkt vorhanden sein. Die Unterschiede bei den Signalstärken innerhalb der untersuchten Pflanzen war jedoch zu diesem Zeitpunkt bei allen Hybridisierungen, im Vergleich zu den anderen Meßpunkten, deutlich erhöht. Innerhalb der Varianz befinden sich die ermittelten Signalstärken bei *Tomate-lo1* an den ersten drei Meßpunkten zumindest auf einer vergleichbaren Ebene. Der 18.00 Uhr-Wert liegt jedoch klar unter dem 9.00 Uhr-Ausgangswert. Die Transkriptmenge des high-affinity Nitrat-transporters *Tomate-hi3* zeigt einen Verlauf, der zu *Tomate-lo1* komplementär erscheint. Im Tagesverlauf erhöht sich, mit einem kleinen Einbruch bei 15.00 Uhr, die Signalstärke etwa auf das Doppelte.
Ausgehend von diesen Resultaten wurde, um vergleichende Transkriptanalysen auch unter weniger optimaler Nährstoffversorgung zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen durchführen zu können, der Erntezeitpunkt der Pflanzen auf den späten Nachmittag, in das letzte Drittel der Lichtphase gelegt. Im Vergleich zu anderen Zeitpunkten kann hier mit einer verstärkten Expression von Nitrattransportergenen gerechnet werden.

3.4.3 Einfluß verschiedener Stickstoffquellen auf die Expression von Nitrat-transportergenen in Tomatenwurzeln

Zur Untersuchung der Expression von low- und high-affinity-Nitrattransportergenen in Tomatenwurzeln wurden zwölf Wochen alte Tomatenpflanzen, die in 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) gewachsen waren, für fünf Tage in Schalen mit nahezu stickstofffreier (0,042 µM NH_4^+; siehe Kapitel 2.1.6), nitrathaltiger oder reduzierten Stickstoff (Ammonium, Glutamin) bzw. Kombinationen dieser Komponenten enthaltenden Nährlösungen vergleichbarer Ionenstärke überführt. Nach Ernte der Pflanzen und Isolierung von Gesamt-RNA wurden Northern-Analysen durchgeführt und die auftretenden Signale quantifiziert (Abb.26 und 27). Für *Tomate-hi3* treten die stärksten Signale bei Kultur mit Glutamin, bzw. der Kombination von Glutamin und Nitrat als Stickstoffquellen auf. Ein vergleichbar starkes Signal ist weiterhin auch im Ansatz mit 7,5 mM Nitrat als wesentliche Stickstoffquelle in der Nährlösung (0,042 µM NH_4^+; Kapitel 2.1.6) zu erkennen. Ein deutlich schwächeres Signal ist für die Kombination von Nitrat und Ammonium zu beobachten. Ammonium reprimiert offensichtlich, wie in Spur 4 (Abb.26) zu erkennen, die Expression von *Tomate-hi3* in erheblichem Maße. Bei Wachstum in nahezu N-freier Nährlösung treten für *Tomate-hi3* ebenfalls nur schwache Signale auf. Bei Hybridisierung mit der Gensonde für *Tomate-hi2* ist ein ähnliches Expressionsmuster wie für *Tomate-hi3* zu beobachten. Allerdings ist mit Glutamin als Stickstoffquelle (Spur3) die Expression von *Tomate-hi2*, im Gegensatz zu *Tomate-hi3*, in erheblichem Maße (etwa 75%) reduziert.
Für *Tomate-lo1* sind in der Northern-Analyse in Tomatenwurzeln aller Versuchsansätze Transkripte nachweisbar. Die Signalstärke mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle ist sogar noch geringer als im Ansatz mit nahezu stickstofffreier Nährlösung. Im Ansatz mit Ammonium als Stickstoffquelle (4) ist, im Vergleich zu Spur 5 oder 6 (NO_3^- & NH_4^+ bzw. NO_3^- als Stickstoffquelle), keine deutliche Reduktion des Signals zu erkennen. Zur weiteren Absicherung dieser Resultate wurden die Wurzel-RNA-Proben aus den unterschiedlichen Ansätzen zusätzlich mit Sonden für eine Nitritreduktase und die Nitratreduktase aus Tomate hybridisiert und die Nitratreduktase-Aktivitäten (NRA) der Wurzeln zum Erntezeitpunkt gemessen (Abb. 26 und 27).

Abbildung 26:

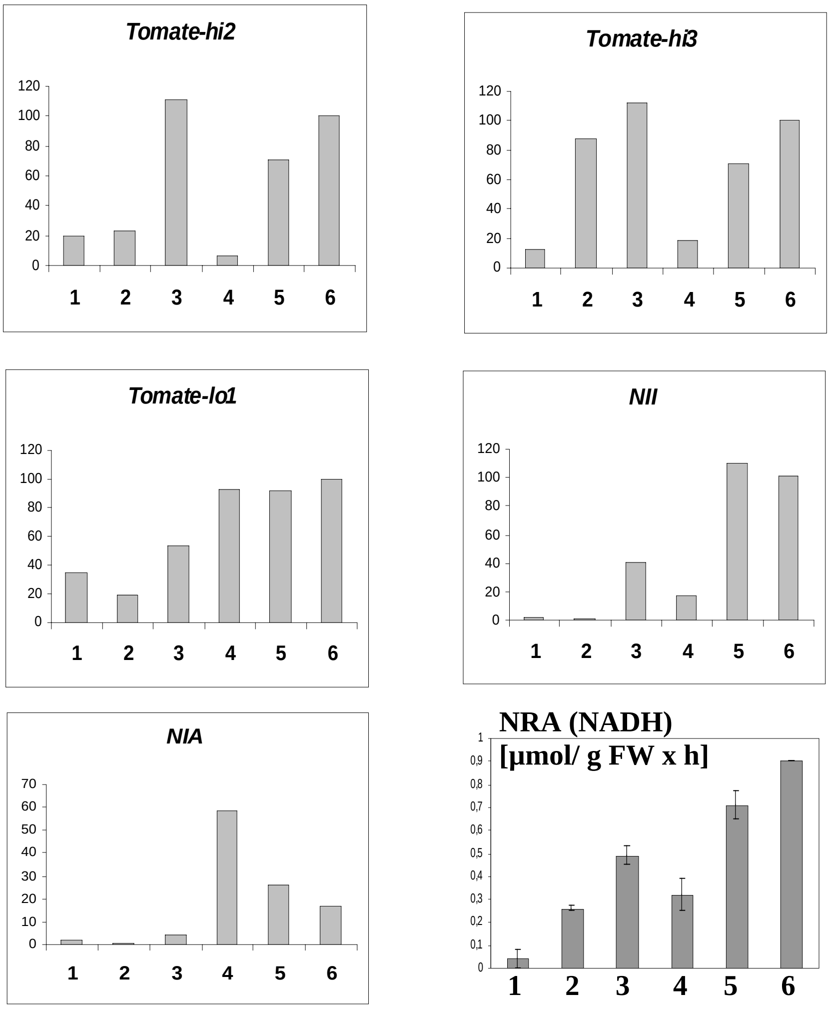


1: „N-frei" (Stickstoff nur in Spuren (NH_4^+) vorhanden)
2: 7,5 mM Glutamin
3: 3,75 mM Glutamin und 3,75 mM NO_3^-
4: 7,5 mM NH_4^+ (NH_4Cl)
5: 3,75 mM NH_4^+ und 3,75 mM NO_3^-
6: 7,5 mM NO_3^-

Legende zu Abbildungen 26 und 27:

Northern-Analyse zur Untersuchung der Expression von low- und high-affinity Nitrattransportergenen, eines Nitrat- (*NIA*) und Nitritreduktasegens (*NII*) sowie Darstellung der NADH-abhängigen Nitratreduktaseaktivität (NRA) von Tomatenwurzeln (Abb.27), die für fünf Tage in mit verschiedenen Stickstoffquellen (1-6) modifizierter 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) kultiviert worden waren. Die aus den Wurzeln von jeweils drei Pflanzen isolierte RNA wurde durch Gelelektrophorese aufgetrennt (20 µg/Spur) und auf BiodyneB-Membran (Pall) übertragen. Jede Spur entspricht der isolierten RNA aus Pflanzen, die mit den angegebenen verschiedenen Nährlösungen behandelt worden waren. Die Hybridisierungen erfolgten ü.N. bei 68°C mit Digoxigenin markierten RNA-Sonden. Eingesetzt wurden die für *Tomate-hi3*, *Tomate-hi2* und *Tomate-lo1* spezifischen Sonden (siehe Kapitel 3.1.6.2) sowie Sonden für Nitratreduktase- und Nitritreduktasegen (T3-1; TNiR2-1) aus Tomate. Zur Auftragungskontrolle wurden die Filter nach der Chemilumineszenzdetektion der spezifischen Transkripte mit einer RNA-Sonde aus dem 18S-rRNA-Gen von Tomate hybridisiert. Der Nachweis erfolgte kolorimetrisch. Die erhaltenen Signale wurden densitometrisch vermessen und mit den Signalen der 18S-rRNA normalisiert. Angegeben ist das Mittel der relativen Signalstärken zweier unabhängiger Northern-Hybridisierungen. Die Signalstärke von Ansatz 6 wurde willkürlich gleich 100 gesetzt (Ausnahme: *NIA*) Die Nitratreduktaseaktivität (NRA) in Wurzelextrakten wurde durch Messung der enzymatischen Bildung von Nitrit aus zugesetztem Nitrat mit NADH als Elektronendonor bestimmt. Für jede Probe wurde die NRA in zwei unabhängigen Ansätzen gemessen. Die angegebenen Fehlerbalken repräsentieren die Varianz innerhalb der Messungen.

Abbildung 27: Erhaltene Signalstärken und Nitratreduktase-Aktivitäten



1: Stickstoff nur in Spuren (NH_4^+) vorhanden („N-frei“)
2: 7,5 mM Glutamin
3: 3,75 mM Glutamin und 3,75 mM NO_3^-
4: 7,5 mM NH_4^+ (NH_4Cl)
5: 3,75 mM NH_4^+ und 3,75 mM NO_3^-
6: 7,5 mM NO_3^-
Angegeben sind die gemessenen Signalstärken in relativen Einheiten

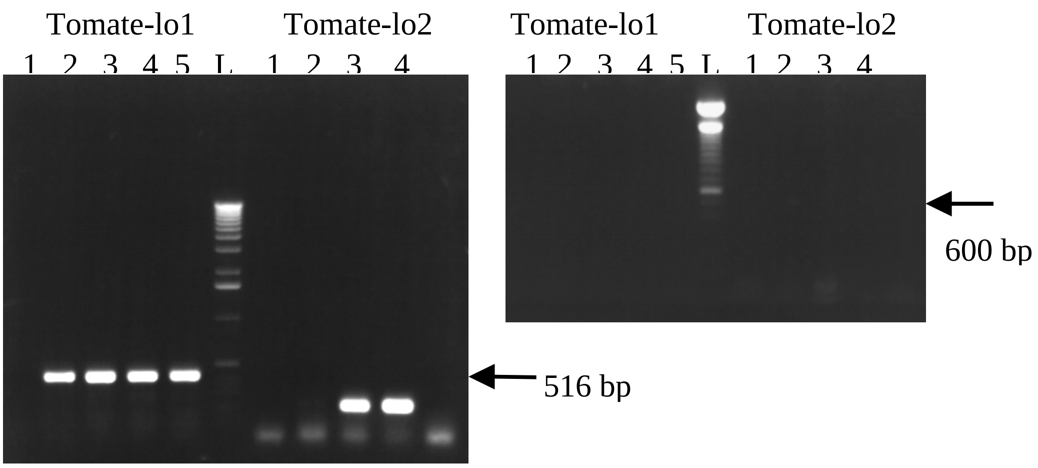
Das Expressionsmuster der Nitritreduktase ähnelt dem mit *Tomate-hi2* auftretenden Muster. Allerdings sind in den Spuren 1 und 2 kaum Signale zu erkennen und die in den Spuren 3 (Glutamin & NO_3^-) und 4 (nur NH_4^+) auftretenden Signale sind erheblich schwächer als die in den Spuren 5 und 6 (NH_4^+ & NO_3^- bzw. nur NO_3^-) zu beobachtenden Signale. Das Signal in Spur 4 ist darüber hinaus deutlich schwächer als das in Spur 3 auftretende Hybridisierungssignal. Die mit der Sonde aus dem Nitratreduktasegen von Tomate erhaltenen Signale stimmen weder in Verteilung noch Stärke mit denen des Nitritreduktasegens überein. Das stärkste Hybridisierungssignal tritt für die Nitratreduktasetranskripte (*NIA*) interessanterweise in Spur 4 mit Ammonium als einziger Stickstoffquelle in der Nährlösung auf.
Weitere deutliche Signalbanden sind bei je 3,75 mM NH_4^+ und NO_3^- (Spur 5) sowie bei 7,5 mM NO_3^- (Spur 6) mit abnehmender Intensität zu erkennen.

Ohne sichtbare einheitliche Korrelation zu den Nitratreduktase-Transkriptanalysen tritt die höchste Nitratreduktaseaktivität bei den in 7,5 mM Nitrat gehaltenen Tomatenwurzeln auf. Die niedrigste NRA ist in Rohextrakten von Tomatenwurzeln, die in nahezu stickstofffreier Nährlösung gewachsen waren, zu beobachten. Deutlich geringere Nitratreduktaseaktivitäten als im Ansatz mit 7,5mM Nitrat sind bei den Ansätzen mit Zusatz der reduzierten Stickstoffformen Ammonium und Glutamin zu erkennen. Bei Vorhandensein von 50% Nitrat in den Nährlösungen treten intermediäre Nitratreduktaseaktivitäten auf (2 und 4).

3.4.4 RT-PCR-Nachweis von Nitrattransportertranskripten in oberirdischen Pflanzenteilen von Tomate

Die in Abbildung 24 dargestellten Hybridisierungssignale zeigen, daß Nitrattransportertranskripte überwiegend in den Wurzeln der untersuchten Pflanzen nachzuweisen sind. Transkripte des low-affinity Nitrattransportergens *Tomate-lo1* konnten mit geringer Signalintensität auch in isolierter Gesamt-RNA aus Sproßmaterial nachgewiesen werden. Für high-affinity Nitrattransportertranskripte wurden keine Signale erhalten.

Abbildung 28:



A:
1: Wasserkontrolle
2: 2 µl cDNA aus jungen Früchten
3: 2 µl cDNA aus Blüten
4: 2 µl cDNA aus jungen Blättern
5: 2 µl cDNA aus Blättern

B:
1: Wasserkontrolle
2: 1 µl DNase verdaute RNA aus jungen Früchten
3: 1 µl DNase verdaute RNA aus Blüten
4: 1 µl DNase verdaute RNA aus jungen Blättern
5: 1 µl DNase verdaute RNA aus Blättern

Legende zu Abbildung 28:
RT-PCR-Reaktion zum Nachweis von low-affinity Nitrattransportertranskripten (*Tomate-lo1* und *Tomate-lo2*) in oberirdischen Pflanzenteilen von Tomate. Die PCR-Methode bestand aus 40 Zyklen mit einer Primerbindungstemperatur von 50°C. Je 10 µl der PCR-Produkte wurden auf 1% Agarosegelen bei 10 V/cm aufgetrennt. Zur weiteren Bezeichnung siehe Kap. 2.1.7 oder Tabelle 11.

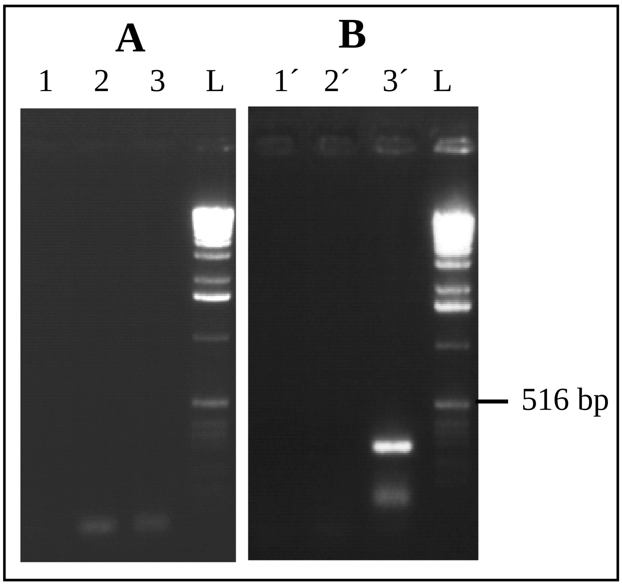
Die RT-PCR erlaubt durch größere Sensitivität, im Vergleich zu RNA-RNA-Hybridisierungen, den Nachweis von sehr geringen Transkriptmengen. Von in 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) gehaltenen Tomatenpflanzen wurde Gesamt-RNA aus

Blättern, Blüten und jungen Früchten isoliert (siehe Kapitel 2.1.7 und Tabelle 11). Die nach Erststrangsynthese mit dem Primer RACE1 erhaltene cDNA wurde dann in PCR-Reaktionen eingesetzt.
Eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 11 dargestellt.
Mit den für das low-affinity Nitrattransportergen *Tomate-lo1* spezifischen Primern PNT2A und RLEMIT1 konnten in allen vier Ansätzen PCR-Produkte der erwarteten Länge von 432 bp erhalten werden (Abb.28A). Mit dem für *Tomate-lo2* spezifischen Primerpaar PNT2B und RLENIT1 wurde mit der cDNA aus Früchten ein sehr schwaches Amplifikat und mit der cDNA aus Blüten und jungen Blättern deutliche Amplifikate der erwarteten Größe von 231 bp erhalten. Mit der cDNA aus Blättern trat kein nach EtBr-Färbung sichtbares PCR-Produkt der erwarteten Größe auf (Abb.28A).
Die mit DNase verdauter RNA durchgeführten Kontrollreaktionen, die eine mögliche Kontamination der cDNA mit genomischer DNA aufzeigen sollten, führten in keinem Fall zu einem PCR-Produkt der erwarteten Größe (Abb.28B) Aus den erhaltenen Resultaten folgt, daß die beiden low-affinity Nitrattransportergene aus Tomate (*Tomate-lo1* und *Tomate-lo2*) in oberirdischen Pflanzenteilen transkribiert werden.
Der Nachweis von high-affinity Nitrattransportertranskripten (*Tomate-hi2* und *Tomate-hi3*) war mit den spezifischen Primern PNT5-7 und PNT5-6 in Kombination mit RTHAT1B bzw. RTHAT2B (siehe Kapitel 3.1.6.2) in jeweils einer PCR-Reaktion mit 35-40 Zyklen, wie für *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2* in Abbildung 28 dargestellt, nicht möglich. Es konnten keine im Agarosegel nach EtBr-Färbung sichtbaren Amplifikate der erwarteten Größe erhalten werden (nicht dokumentiert).

Abbildung 29:

A:
1: Wasserkontrolle (keine Matrize)
2: 1 µl DNase verdaute RNA
3: 2 µl cDNA aus jungen Früchten
Primer: PNT5-7 und RTHAT1B

B:
1´: 1:50 verdünntes PCR-Produkt A1
2´: 1:50 verdünntes PCR-Produkt A2
3´: 1:50 verdünntes PCR-Produkt A3
Primer: PNT5-7 und RTHAT1A
L: 1 kb-Leiter (Gibco)

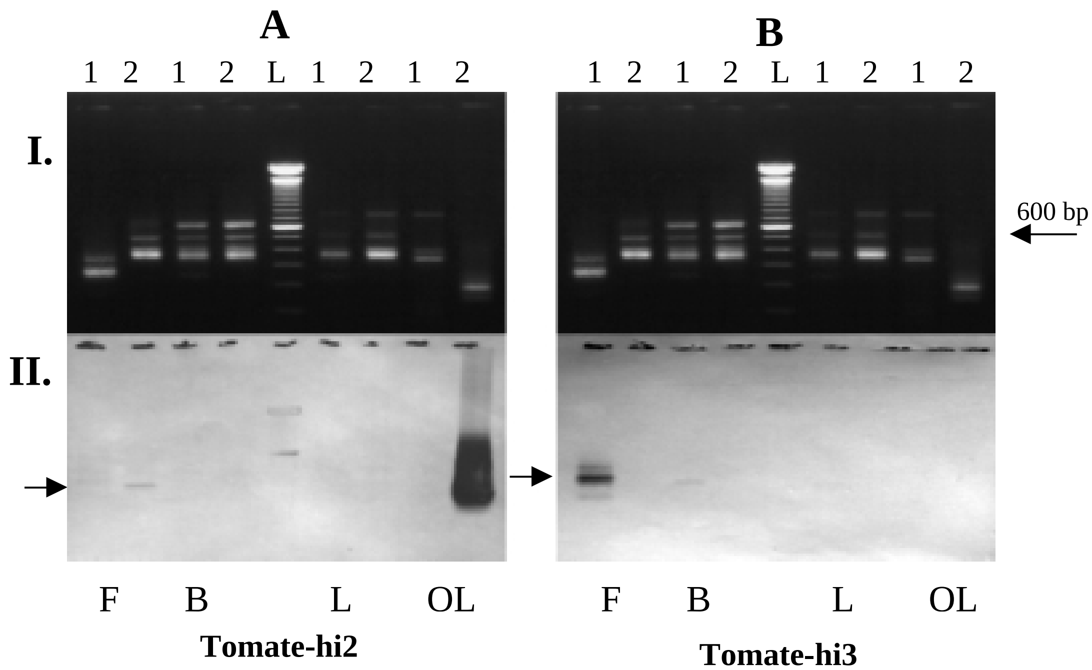


Legende zu Abbildung 29:
Darstellung eines „nested"-RT-PCR-Experimentes zum Nachweis von Transkripten des high-affinity Nitrattransporters *Tomate-hi3* in RNA aus jungen Früchten von Tomate. Die erste PCR-Reaktion bestand nach einer Eingangsdenaturierung von 3 min bei 94°C mit anschließendem „touch-down" der Primerbindungstemperatur in Schritten von 1°C/Zyklus von 48°C auf 41°C mit weiteren 35 Zyklen mit einer Primerbindungstemperatur von 45°C. Für die zweite „nested"-PCR wurden je 1 µl der 1:50 verdünnten PCR-Produkte der ersten PCR eingesetzt. Die zweite PCR-Reaktion wurde über 40 Zyklen mit einer Primerbindungstemperatur von 50°C durchgeführt.
Je 10 µl der PCR-Produkte wurden auf einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt.

Daher wurden die in den ersten Reaktionen erhaltenen PCR-Produkte 1:50 verdünnt und in eine zweite „nested"-PCR-Reaktion eingesetzt. Dabei wurden nun neben den Primern PNT5-7 und PNT5-6 die weiter 5´-gelegenen spezifischen reversen Primer RTHAT1A und

RTHAT1B eingesetzt. Wie in Abbildung 29 dargestellt, konnte nur mit der cDNA aus jungen Früchten ein deutliches Amplifikat der erwarteten Größe von 288 bp erhalten werden. In den zugehörigen Kontrollreaktionen (Wasserkontrolle und Kontrolle mit DNase verdauter RNA) waren keine Amplifikate der entsprechenden Größe zu beobachten.
Mit der isolierten Gesamt-RNA aus Blättern, Blüten und Früchten durchgeführte 3´-RACE-Experimente (siehe Kapitel 2.3.3.2) und anschließende Hybridisierung mit spezifischen Sonden für den 3´-nichttranslatierten Bereich der high-affinity Nitrattransporter cDNA von *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* (hi2´ bzw. hi3´, siehe Abb.20) bestätigen die im „nested"-PCR Experiment gezeigte Expression von *Tomate-hi3* in jungen Früchten (Abb.30).

Abbildung 30:



1: 3´-RACE-Drittstrangsynthese mit THAT1 und RACE3
2: 3´-RACE-Drittstrangsynthese mit THAT2 und RACE3
F: 3´-RACE mit cDNA aus jungen Früchten
B: 3´-RACE mit cDNA aus Blüten
L: 3´-RACE mit cDNA aus jungen Blättern
OL: 3´-RACE mit cDNA aus Blättern

Legende zu Abbildung 30: Darstellung der PCR-Produkte (I.) von 3´-RACE-Drittstrangsynthesen mit Primern für die high-affinity Nitrattransportergene *Tomate-hi2* und T*omate-hi3*, ausgehend von cDNA aus jungen Früchten (F), Blüten (B), jüngeren und älteren Blättern (L, OL) von in 0,5 x Hoagland-Nährlösung gewachsenen Tomatenpflanzen. Zur Erststrangsynthese wurde der Primer RACE1 eingesetzt. Die Zweitstrangsynthese erfolgte mit dem degenerierten Primer PNT3 in Kombination mit den Primern RACE1 und RACE2 (siehe Kapitel 2.3.3.2). Je 1 µl der cDNA wurde in die PCR-Reaktion zur Zweitstrangsynthese eingesetzt. Nach 3 min Denaturierung bei 94°C, 5 min bei 52°C und 10 min bei 72°C folgten 40 Zyklen bei 52°C mit je 1 min Primerbindungs- und 3 min Elongationszeit. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden 1:50 verdünnt und je 1 µl in die Drittstrang-synthese-PCR-Reaktion mit den Primern THAT1 und THAT2 in Kombination mit RACE3 eingesetzt. Nach 3 min bei 94°C, 2 min bei 55°C und 5 min bei 72°C folgten 40 Zyklen bei 55°C mit je 30 s Primerbindungs- und 1,5 min Elongationszeit. Je 8 µl der PCR-Produkte wurden mit einem 1% Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt und auf eine Nylonmembran (BiodyneB) übertragen. Die Hybridisierung mit den mit Digoxigenin markierten DNA-Sonden hi3´ und hi2´ (siehe Abb.20) erfolgte ü.N. bei 42°C. Die Signale wurden anschließend kolorimetrisch nachgewiesen (II).

Für *Tomate-hi3* ist in Abbildung 30 innerhalb weiterer schwächerer Signale im PCR-Produkt ausgehend von der cDNA aus jungen Früchten ein deutliches Signal bei etwa 240 bp zu erkennen. Wesentlich schwächere Signale treten mit der cDNA aus Blüten und jungen Blättern mit der erwarteten Größe von etwa 240 bp auf. Für *Tomate-hi2* lassen sich nur zwei deutliche Signale ausmachen. Ein außerordentlich starkes Hybridisierungssignal mit einem Intensitätsschwerpunkt bei etwa 200 bp tritt im PCR-Produkt ausgehend von der cDNA aus älteren Blättern auf. Deutlich geringere Signalintensität zeigt das bei etwa 190 bp zu erkennende Signal in der Spur des RACE-PCR-Produktes ausgehend von der cDNA aus jungen Früchten. Die Längen der signalgebenden Amplifikate entsprechen, bei Betrachtung der Resultate der RACE-Experimente mit Wurzel cDNA, der Erwartung (Klone PNT5.6-1→ 189bp und PNT5.7-1→ 239bp, Abschnitt 3.1.6.2, Abb. 19). Die visuell im mit EtBr gefärbten Agarosegel sichtbaren Amplifikatbanden entsprechen zum Teil nicht den nach Hybridisierung erhaltenen Signalbanden.
Zwischen den unterschiedlichen RACE-Ansätzen (Spuren 1 und 2, Abb.30) kommt es trotz Verwendung der identischen RACE-Primer (RACE1-3) zu keinen wesentlichen Kreuzhybridisierungen. Dies bestätigt die Spezifität der im 3´-RACE verwendeten Primer und der zur Hybridisierung eingesetzten mit Digoxigenin markierten Sonden. Eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA konnte durch entsprechende Ansätze mit DNase verdauter RNA, die auch zur cDNA-Synthese eingesetzt worden war, ausgeschlossen werden (nicht dokumentiert).Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß auch high-affinity Nitrattransportergene (*Tomate-hi2* und *Tomate-hi3*) in oberirdischen Pflanzenteilen von Tomate transkribiert werden.

Aus den durchgeführten RT-PCR- und RACE-Versuchen ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 11: Zusammenfassung der Resultate zur Expression von Nitrattransportergenen in oberirdischen Pflanzenteilen von Tomate

Gene	junge Früchte	Blüten	junge Blätter	Blätter
Tomate-lo1	+	+	+	+
Tomate-lo2	+	+	+	-
Tomate-hi2	**- (+)**	**- (-)**	**- (-)**	**- (+)**
Tomate-hi3	**+ (+)**	**- (+)**	**- (+)**	**- (-)**

+ : Transkripte nachgewiesen (RT-PCR)
- : Transkripte nicht nachgewiesen (RT- PCR)
( ) : Resultate der RACE-Experimente

Bei dem zur RNA-Isolierung und für *In situ*-Hybridisierungsexperimente eingesetzten oberirdischen Pflanzenteilen ist folgendes zu beachten:

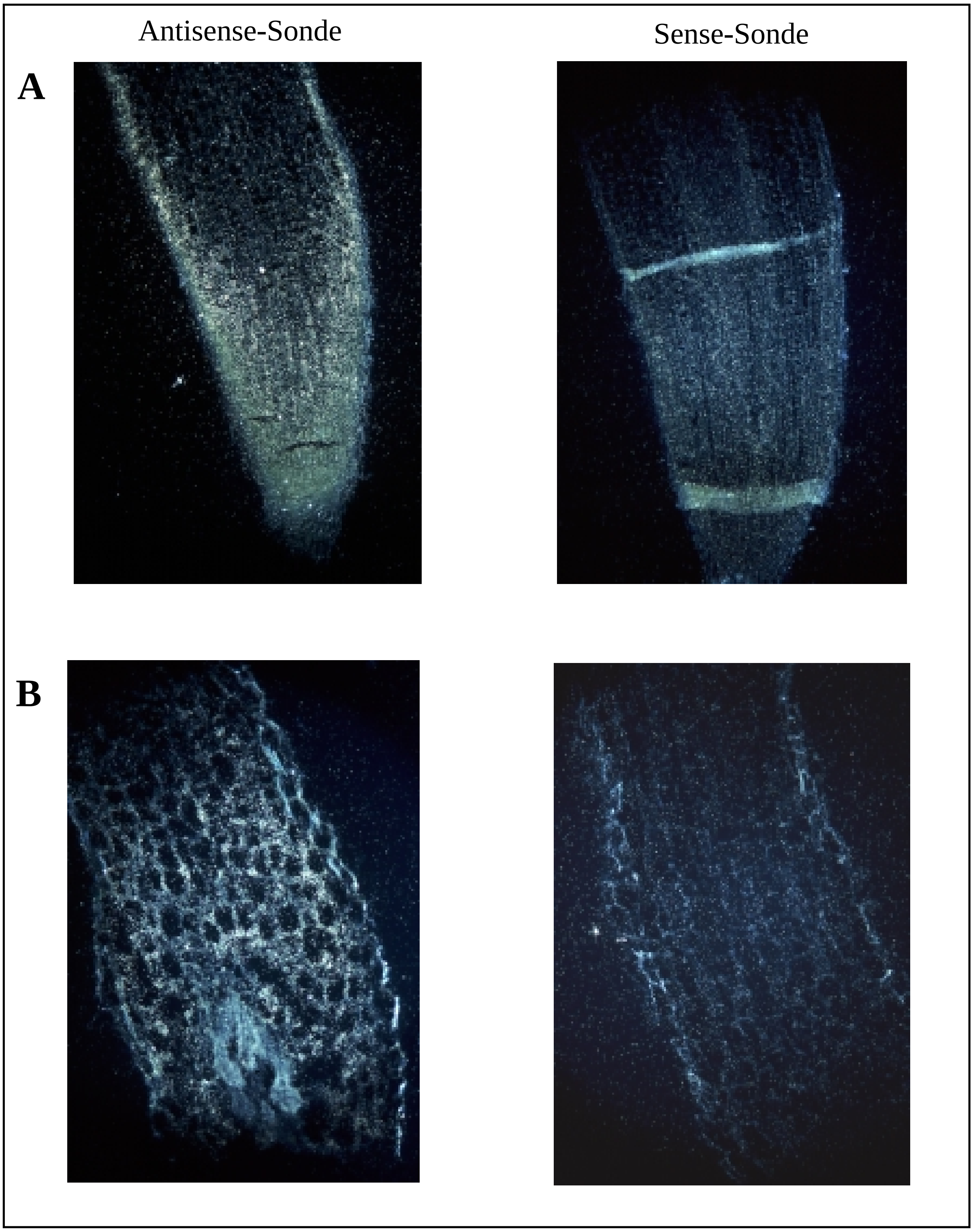
1. Bei den „jungen“ Blättern handelt es sich um noch nicht voll entfaltete Blätter.
2. Als „Blätter“ werden voll entwickelte Blätter bezeichnet.
3. Bei den verwendeten Blüten handelt es sich um vollständige Blüten mit allen zugehörigen Teilen.
4. Als „junge“ Früchte werden solche bezeichnet, die einen Durchmesser von maximal 1 cm aufweisen.

3.5 Lokalisierung von Nitrattransportertranskripten in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen

3.5.1 Lokalisierung der Transkripte von low- und high-affinity Nitrattransporter-genen in Tomatenwurzeln

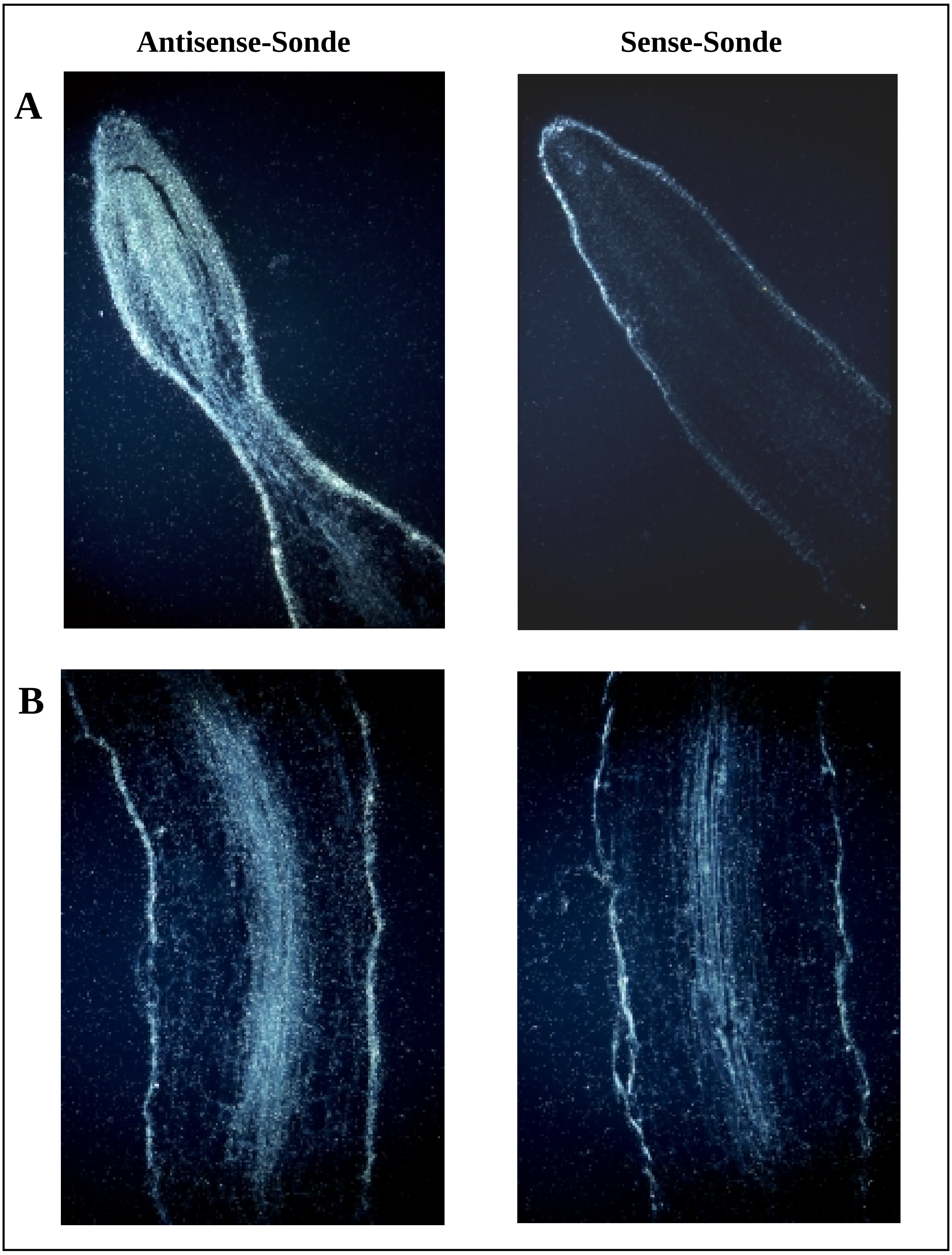
Zur Untersuchung des Expressionsmusters von low- und high-affinity-Nitrattransporter-genen in Tomate wurden *In situ*-RNA-Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Anti-sense- und Sense-RNA-Sonden (hi3 aus *Tomate-hi3* und lo1 aus *Tomate-lo1*) mit Längs-schnitten von in Fibrowax eingebetteten (Kap. 2.7.3) Tomatenwurzeln (Kap.3.4.1) durch-geführt. Zur Steigerung der mRNA-Gehalte der zu untersuchenden Gene waren die einge-setzten Tomatenpflanzen nach einwöchigem Wachstum in nahezu N-freier Nährlösung 6 h vor der Ernte der Pflanzen in Schalen mit nitrathaltiger Nährlösung überführt worden (Kap. 3.4.1). Wegen des hohen experimentellen Aufwandes wurden die Untersuchungen auf nur je einen Vertreter der low- und high-affinity-Nitrattransporter-Familie beschränkt. Die in den Abbildungen 31 und 32 dargestellten Mikroautoradiographien von *In situ*-Hybri-disierungen zeigen Expressionsmuster für die beiden untersuchten Gene *Tomate-lo1* und *Tomate-hi3*. Für *Tomate-lo1* sind Transkripte in jungen Wurzelteilen in der Wurzelspitze, in der Rhizodermis (Abbildung 31A) und in älteren Wurzelabschnitten (Abb. 31B) verstärkt in den inneren Schichten des Cortex und deutlich reduziert in der Rhizodermis zu erkennen. Die in Abb. 31A im Schnitt mit der Sense-Hybridisierung zu erkennenden Quer-streifen sind auf Stauchungen des Schnittes während des Schneidens zurückzuführen. Die Signale der Transkripte von *Tomate-hi3* sind ebenfalls recht deutlich in Zellen der Wurzelspitze und in den Zellen der Rhizodermis zu erkennen (Abbildung 32A), bleiben dann aber in älteren Wurzelteilen im wesentlichen auf die Rhizodermis beschränkt (Abbildung 32B). Weniger deutliche Signale für *Tomate-hi3* treten zusätzlich an den Zellen des Zentralzylinders auf. Diese Signale konnten jedoch nicht bei allen untersuchten Schnitten be-obachtet werden. Die mit der jeweiligen Sense-RNA-Sonde durchgeführten Kontrollen zeigen in den Bereichen, in denen bei den Antisense-Hybridisierungen starke Signale auftreten, eine leicht über den unspezifischen Hintergrundsignalen liegende Dichte von Silberkörnern. Ein im Dunkelfeld zum Teil recht intensives Leuchten einiger Zellwände, insbesondere der Rhizodermis, erschwert die optische Unterscheidung von ebenfalls stark leuchtenden Silberkörnern. Interessanterweise sind sowohl für *Tomate-lo1* wie auch für *Tomate-hi3* deutliche Signale in den noch nicht ausdifferenzierten Zellen der Rhizodermis (möglicherweise auch in Zellen der Wurzelhaube) und des Rinden-parenchyms an den Wurzelspitzen zu erkennen (Abb. 31 und 32). Um präzisere Aussagen zur Lokalisation von signalgebenden Silberkörnern zu machen, wurden die Resultate der *In situ*-RNA-Hybridisierungen, wie in Tabelle 12 dargestellt, quantifiziert. Es wurde jeweils die Anzahl von Silberkörnern auf einer Fläche von 100 μm^2 mit Hilfe eines Bildbearbeitungs-programms ausgezählt. Als problematisch erwiesen sich dabei die Zellen in den Wurzelspitzen. Sowohl die relativ dicken Schnitte (Ø10 µm), die relativ kleinen Zellen und die z.T. sehr hohe Silberkorndichte, die eine Unterscheidung einzelner Silberkörner nicht mehr ermöglichte, verhindern eine direkte Zuordnung der Signale zu bestimmten Zelltypen. Daher wurde die Quantifizierung der Silberkörner im wesentlichen auf Wurzelabschnitte unmittelbar hinter der Wurzelspitze und auf ältere Wurzelteile beschränkt (Tabelle 12). Zellen des Rindenparenchyms, die offenbar mit großen Vakuolen ausgestattet sind, führen flächenbezogen zu reduzierten Silberkorn-Durchschnittswerten. Allgemein sind nur die für jeweils eine Sonde und einen Sondentyp (Antisense- oder Sense-RNA-Sonden) erhaltenen Daten miteinander vergleichbar. Die erhaltenen Daten bestätigen die mit bloßem Auge erkennbare Verteilung von Silberkörnern in den Abbildungen 31 und 32.

Abbildung 31: Lokalisation der Transkripte von *Tomate-lo1* durch *In situ*-RNA-Hybridisierung in Tomatenwurzeln



Legende zur Abbildung 31: Dunkelfeldaufnahmen von in Fibrowax eingebetteten Tomatenwurzel-Längsschnitten junger (mit Wurzelspitze) (31A) und älterer Wurzelbereiche (31B). Diese wurden mit der Antisense-RNA-Sonde lo1 (*Tomate-lo1*) oder der entsprechenden Sense-RNA-Sonde bei 50°C ü.N. *in situ* hybridisiert. Die Signale wurden durch Mikroautoradiographie *in situ* nachgewiesen. Die zwölf Wochen alten Pflanzen wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen mit nahezu N-freier 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) kultiviert und dann 6 h vor der Ernte mit nitrathaltiger (7,5 mM NO_3^-) 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) versetzt.

Abbildung 32: : Lokalisation der Transkripte von *Tomate-hi3* durch *In situ*-RNA-Hybridisierung mit Tomatenwurzeln



Legende zur Abbildung 32: Dunkelfeldaufnahmen von in Fibrowax eingebetteten Tomatenwurzel-Längsschnitten junger (mit Wurzelspitze) (32A) und älterer Wurzelbereiche (32B). Diese wurden mit der Antisense-RNA-Sonde hi3 (*Tomate-hi3*) oder der entsprechenden Sense-RNA-Sonde bei 50°C ü.N. *in situ* hybridisiert. Die Signale wurden durch Mikroautoradiographie *in situ* nachgewiesen. Die zwölf Wochen alten Pflanzen wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen mit nahezu N-freier 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) kultiviert und dann 6 h vor der Ernte mit nitrathaltiger (7,5 mM NO_3^-) 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) versetzt.

Die mit der Antisense-Sonde für *Tomate-lo1* erhaltene Silberkorndichte in Cortex und Epidermis älterer Wurzelteile ist signifikant verschieden von den in der Nähe der Wurzelspitzen gemessenen Werten. So erscheinen die für Rhizodermis und Cortex ermittelten Daten im Vergleich zwischen Wurzelspitze und älteren Wurzelabschnitten nahezu invertiert. Die Expression von *Tomate-hi3* bleibt der gemessenen Silberkorndichte zufolge in signifikanter Weise auf die Zellen der Rhizodermis beschränkt. Mit den Sense-Sonden für *Tomate-lo1* und *Tomate-hi3* kommt es im Vergleich zu den Hintergrundsignalen des Objektträgers zu leicht verstärkten Silberkorndichten an den Wurzelschnitten. Die Anzahl der Silber-körner ist innerhalb der Wurzelschnitte stets höher als auf der Oberfläche der Objektträger. Diese Signale lassen sich möglicherweise auf eine unspezifische Bindung oder Hybridisierung zurückführen.
Eine mögliche Expression der beiden untersuchten Gene in Wurzelhaaren konnte aufgrund der geringen Intaktheit von Wurzelhaaren nach der Ernte der Wurzeln, bedingt durch die Kultivierungsmethode der Pflanzen (in Töpfen mit Quarzsand als Substrat), nicht weiter untersucht werden.

Tabelle 12: Anzahl der Silberkörner in Rhizodermis und Cortex von Tomatenwurzeln (n =10)

	Antisense-Sonde			Sense-Sonde		
Tomate-lo1	Rhizodermis	Cortex	Hintergrund	Rhizodermis	Cortex	Hintergrund
Wurzelspitze	75 ± 26	8 ± 4	8 ± 4	15 ± 6	15 ± 11	2 ± 1
ältere Wurzelteile	10 ± 3	50 ± 14	3 ± 2	8 ± 5	10 ± 5	3 ± 2
Tomate-hi3						
Wurzelspitze	43 ± 18	9 ± 5	2 ± 2	5 ± 4	7 ± 6	2 ± 1
ältere Wurzelteile	49 ± 5	7 ± 4	4 ± 1	4 ± 2	8 ± 2	4 ± 2

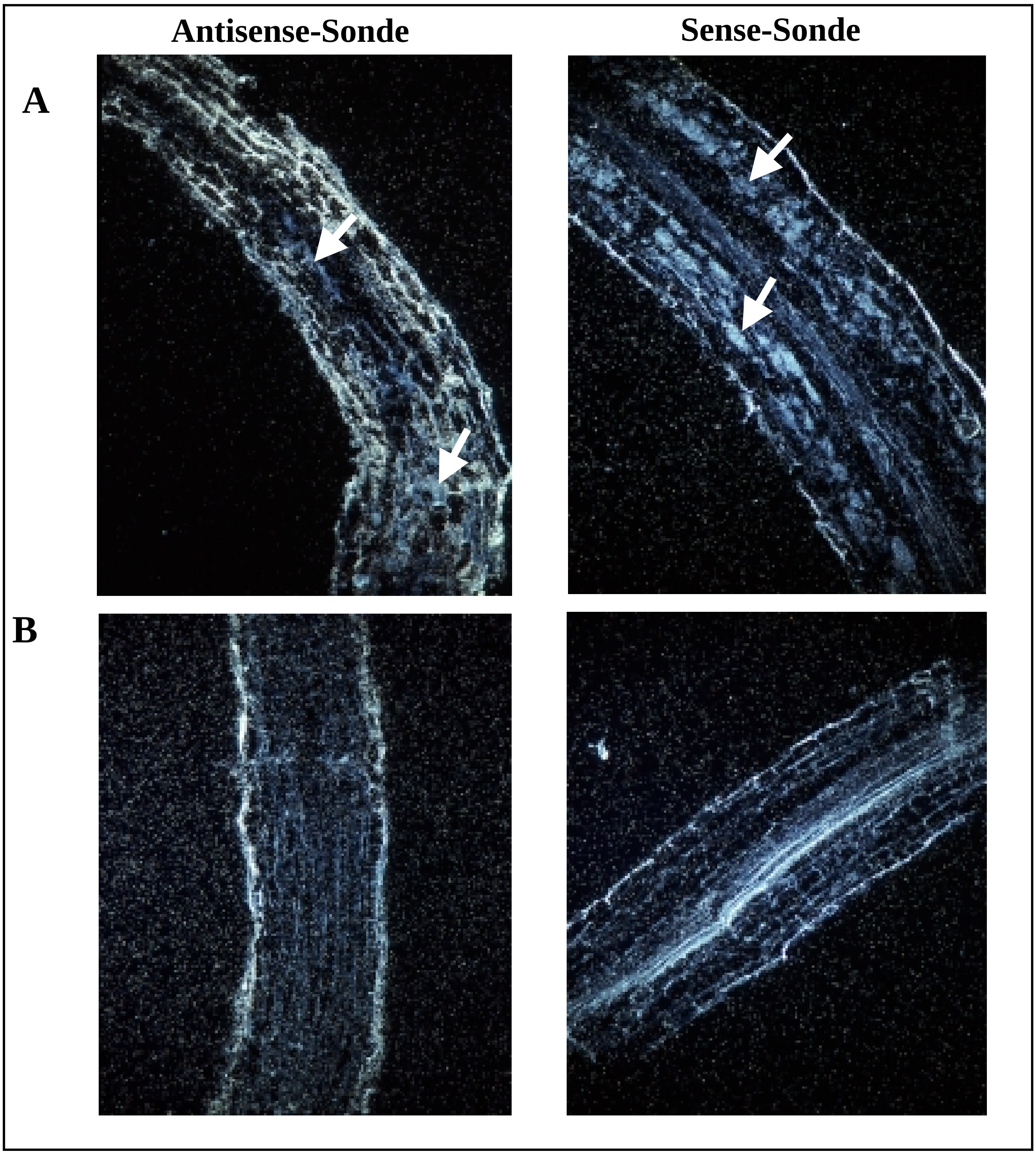
Legende zu Tabelle 12:
Längsschnitte von in Fibrowax eingebetteten Tomatenwurzeln wurden *in situ* mit Sense-, bzw. Antisense-RNA-Sonden für *Tomate-lo1* oder *Tomate-hi3* hybridisiert. Die zwölf Wochen alten Pflanzen wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen mit nahezu N-freier 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) kultiviert und dann 6h vor der Ernte mit nitrathaltiger (7,5 mM NO_3^-) 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) versetzt. Die durchschnittliche Anzahl der Silberkörner einer Fläche von 100 µm^2 wurde ermittelt. Die auftretenden Hintergrundsignale (Hintergrund: Silberkörner auf der Oberfläche des Glas-Objektträgers in unmittelbarer Nähe der Wurzelschnitte) wurden von den in den Wurzelschnitten auftretenden Werten subtrahiert. Es wurden je zehn Zählungen an mindestens zwei verschiedenen Schnitten durchgeführt. Angegeben sind die jeweiligen Standardabweichungen.

3.5.2 Lokalisierung der Transkripte von low- und high-affinity Nitrattransportergenen in mykorrhizierten Tomatenwurzeln

Zur Untersuchung einer möglichen Änderung in der Lokalisation von Nitrattransportertranskripten in mykorrhizierten Tomatenwurzeln wurden *In situ*-Hybridisierungen mit stark mykorrhizierten Wurzeln (> 90%) 12 Wochen alter Tomatenpflanzen durchgeführt. Zur Kontrolle wurden unter gleichen Bedingungen kultivierte, nicht-mykorrhizierte Tomatenwurzeln eingesetzt. Die Pflanzen unterschieden sich dabei hinsichtlich ihres Wachstums nur im Blühzeitpunkt, der bei den mykorrhizierten Pflanzen etwa eine Woche früher zu beobachten war. Die Hybridisierung erfolgte mit den spezifischen Sonden für *Tomate-lo1* und *Tomate-hi3*. Am Tag vor der Ernte waren die Pflanzen mit 30 ml einer 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) gedüngt worden. Für *Tomate-lo1* konnten sowohl in den mykorrhizierten wie auch in den nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln keine deutlichen

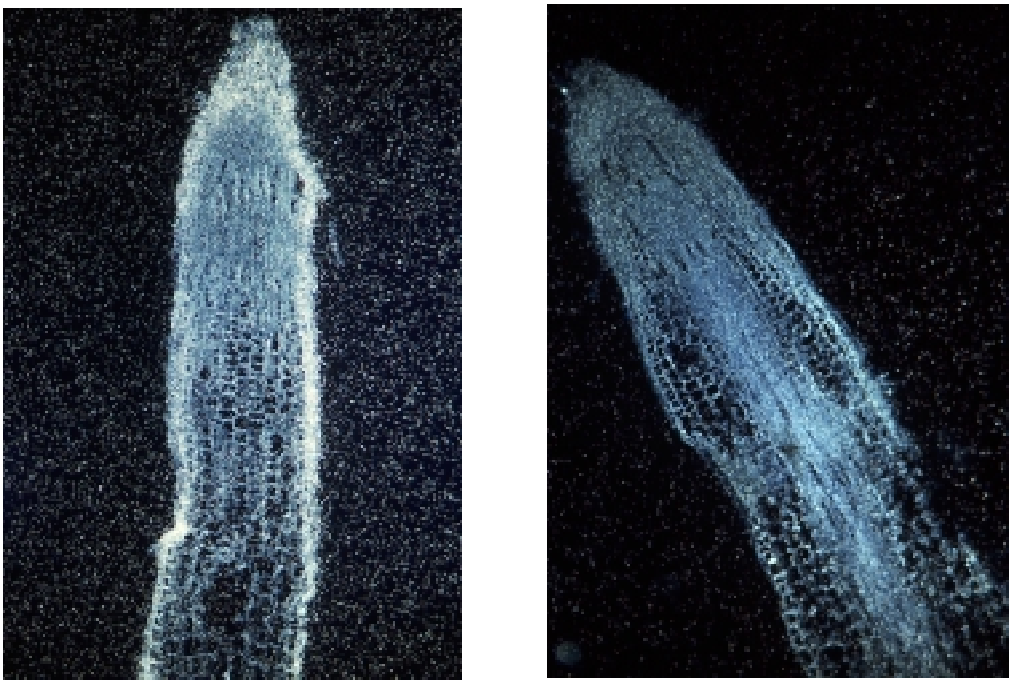
Signale erhalten werden. Im Gegensatz dazu führte die *In situ*-Hybridisierung mit der Sonde für *Tomate-hi3* zu deutlichen Signalen in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln. Dabei entspricht das Expressionsmuster von *Tomate-hi3* in den nicht-mykorrhizierten Wurzeln (Abb. 33B und 33C) im wesentlichen den Resultaten der *In situ*-Hybridisierung mit der Sonde für *Tomate-hi3* in Tomatenwurzeln, die 6 h vor der Ernte mit 7,5 mM Nitrat versetzt worden waren (Abb.32). Aufgrund unterschiedlicher Schnittebenen sind jedoch keine Aussagen über eine Expression von *Tomate-hi3* in der Umgebung des Zentralzylinders möglich. In mykorrhizierten Wurzeln erkennt man hingegen, daß Transkripte von *Tomate-hi3*, im Gegensatz zu nicht-mykorrhizierten Wurzeln, nicht mehr nur auf die Rhizodermis beschränkt sind, sondern auch in umliegenden Zellen des Cortex zu Signalen führen (Abb.33A). Eine verstärkte Expression in unmittelbarer Nähe der pilzlichen Arbuskeln tritt nicht auf. Deutliche Signale sind in den Zellen des äußeren Cortex zu erkennen.

Abbildung 33: Lokalisierung von Transkripten des high-affinity Nitrattransportergens *Tomate-hi3* in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln



Fortsetzung Abbildung 33:

C



Legende zu Abbildung 33: Dunkelfeldaufnahmen von in Fibrowax eingebetteten Tomatenwurzel-Längsschnitten mykorrhizierter (A) und nicht-mykorrhizierter (B und C) junger und älterer Wurzelbereiche. Diese wurden mit der Antisense-RNA-Sonde für *Tomate-hi3* oder der entsprechenden Sense-RNA-Sonde bei 50°C ü.N. *in situ* hybridisiert. Einige Arbuskeln sind durch weiße Pfeile markiert. Die Signale wurden durch Mikroautoradiographie *in situ* nachgewiesen.

Um präzisere Aussagen zur Signalstärke bei Hybridisierungen mit Sense- und Antisense-Sonde in Rhizodermis und Cortex der mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln machen zu können, wurden die bei der *In situ*-Hybridisierung älterer Wurzelteile erhaltenen Signale quantifiziert. An Wurzelspitzen ließ sich wegen der dort auftretenden z.T. extrem hohen Silberkorndichte keine Quantifizierung durchführen, da dort eine Differenzierung der einzelnen Silberkörner nicht möglich ist. Aufgrund der unterschiedlichen Zellgrößen wurde in Rhizodermis, Hypodermis und in Zellen des Cortex die durchschnittliche Anzahl der Silberkörner einer Fläche von jeweils 100 μm^2 bestimmt (Tabelle 13).
Dabei wird deutlich, daß es mit allen Sonden zu geringen unspezifischen Signalen an den Wurzelschnitten kommt. Die Anzahl der Silberkörner ist innerhalb der Wurzelschnitte stets höher als auf der Oberfläche der Objektträger. Die Anzahl der Silberkörner in der Epidermis von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln bei der Hybridisierung mit der Antisense-RNA-Sonde für *Tomate-hi3* unterscheidet sich kaum.
Signifikante Unterschiede treten allerdings, wie auch in Abb.33A zu erkennen, in Hypodermis und Cortex der mykorrhizierten Wurzeln auf, die eine etwa drei- bis vierfach erhöhte Silberkorndichte im Vergleich zu den nicht-mykorrhizierten Wurzeln aufweisen.

Tabelle 13: Quantifizierung der Resultate der *In situ*-Hybridisierungen für *Tomate-hi3* in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln

(n =10)	Rhizodermis	Hypodermis	Cortex	Hintergrund
mykorrhiziert, sense	32 ± 14	18 ± 3	23 ± 9	11 ± 2
nicht mykorrhiziert, sense	18 ± 4	14 ± 2	16 ± 3	20 ± 4
mykorrhiziert, antisense	120 ± 25	105 ± 34	63 ± 36	35 ± 14
nicht mykorrhiziert, antisense	111 ± 32	32 ± 2	10 ± 3	30 ± 6

Legende zu Tabelle 13:
Längsschnitte von in Fibrowax eingebetteten mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln wurden *in situ* mit Sense-, bzw. Antisense-RNA-Sonden für *Tomate-hi3* hybridisiert. Die durchschnittliche Anzahl der Silberkörner einer Fläche von 100 μm^2 wurde ausgezählt. Die unmittelbar an die Rhizodermis anschließenden beiden Zellschichten wurden als zur Hypodermis zugehörig angesehen. Die auftretenden Hintergrundsignale (Hintergrund: Silberkörner auf der Oberfläche des Glas-Objektträgers in unmittelbarer Nähe der Wurzelschnitte) wurden von den in den Wurzelschnitten auftretenden Werten subtrahiert. Es wurden je mindestens zehn Zählungen an zwei verschiedenen Schnitten durchgeführt. Angegeben sind die jeweiligen Standardabweichungen.

Hyphen von *Glomus intraradices* sind in den Schnitten nicht zu erkennen. Demzufolge können auch keine Aussagen über eine mögliche Expression von *Tomate-hi3* in der Nähe der intraradikalen Hyphen gemacht werden.
Ferner kommt es an den Vesikeln sowohl mit Sense- und Antisense-RNA-Sonden zu z.T. recht starken Signalen, die sich wahrscheinlich auf eine unspezifische Hybridisierung zurückführen lassen (nicht dokumentiert).

3.5.3 Lokalisierung von Nitrattransportertranskripten in Geweben oberirdischer Pflanzenteile von Tomate

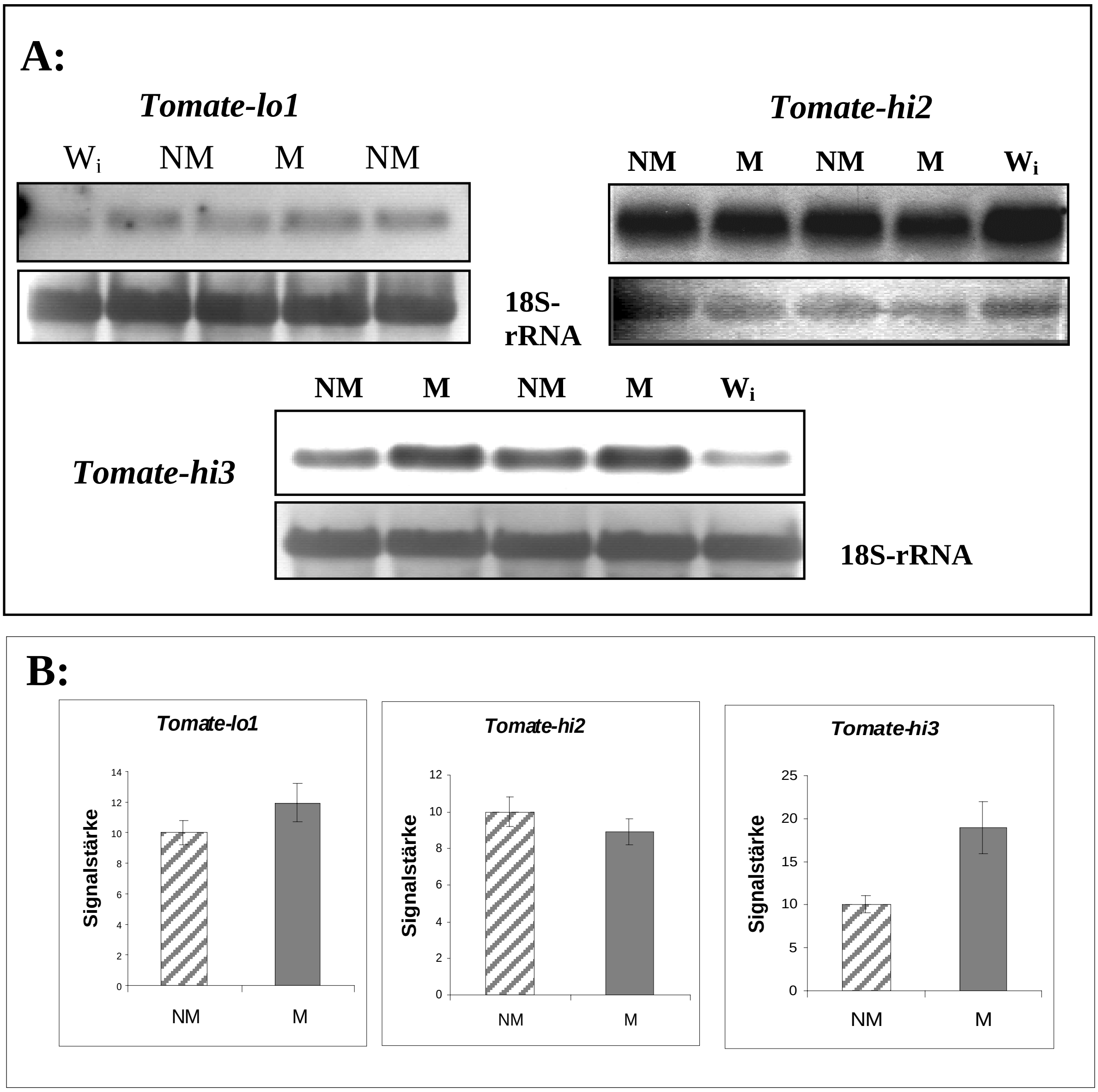
Zur Lokalisierung von Nitrattransportertranskripten in oberirdischen Pflanzenteilen von Tomate wurden Schnitte von Blättern, Stengeln, Früchten und Blüten von 12 Wochen alten, in 0,5 x Hoagland-Nährlösung (pH 6,0) herangewachsenen Pflanzen angefertigt.
Die *In situ*-Hybridisierung dieser Schnitte erfolgte mit den Sonden hi3, für das high-affinity Nitrattransportergen *Tomate-hi3*, und lo1, für das low-affinity Nitrattransportergen *Tomate-lo1*. Dabei konnten keine über die auftretenden Hintergrundsignale hinausgehenden spezifischen Depositionen von Silberkörnern in Gewebeschnitten, die mit Sense- oder Antisense-RNA-Sonden hybridisiert worden waren, festgestellt werden (nicht dokumentiert).

3.6 Northern-Analysen zur Untersuchung der Expression von Nitrattransportergenen in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln

Zur Klärung einer möglichen differentiellen Expression von Nitrattransportergenen in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln wurden Northern-Analysen durchgeführt. Die bei den Kontrollpflanzen zu beobachtenden Mykorrhizierungswerte von 4% sind vermutlich durch Kreuzinfektionen, ausgehend von den mykorrhizierten Pflanzen im Gewächshaus, zu erklären. Im weiteren werden diese Pflanzen als nicht-mykorrhiziert

bezeichnet (Tabelle 14). In der Regel betrachtet man Pflanzen mit einer Mykorrhizierung der Wurzellänge unter drei Prozent als nicht signifikant und damit als nicht-mykorrhiziert. Die bei den Northern-Analysen erhaltenen Signale wurden densitometrisch vermessen. Der Vergleich der erhaltenen Signalintensitäten bei Hybridisierungen mit der Sonde lo1 (*Tomate-lo1*) und der Sonde hi2 (*Tomate-hi2*) mit RNA aus mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln ergab keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 34).

Abbildung 34:

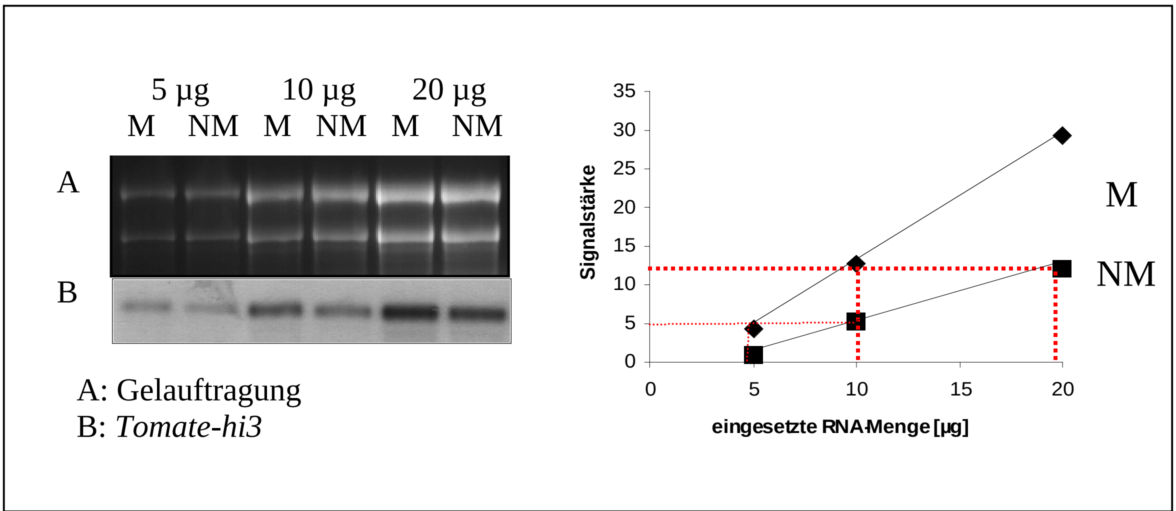


Legende zu Abbildung 34: Aus Wurzeln von 14 Wochen alten Tomatenpflanzen mit und ohne Kolonisierung mit *Glomus intraradices* Sy167 wurde RNA isoliert. Die RNA wurde durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf HybondN-Nylonmembran (Amersham) übertragen. Die Filter wurden mit den spezifischen digoxigeninmarkierten Antisense-RNA-Sonden lo1(*Tomate-lo1*), hi3 (*Tomate-hi3*) und hi2 (*Tomate-hi2*) bei einer Inkubationstemperatur von 68°C ü.N. hybridisiert. Der Chemilumineszenznachweis erfolgte wie in Kapitel 2.6.6 beschrieben. Nach Entfernung der hybridisierten nitrattransporterspezifischen Sonden erfolgte eine Hybridisierung mit einer Sonde für die 18S-rRNA (Kiss et al., 1989) aus Tomate. Die erhaltenen Signale wurden densitometrisch vermessen und gegen die Signale der 18S-rRNA normalisiert. A: Exemplarische Darstellung der erhaltenen Signale eines Versuches von insgesamt drei unabhängigen Versuchsansätzen mit RNA aus je vier mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen (n = 4). B: Grafische Darstellung

der Ergebnisse der drei unabhängigen Versuche. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittleren quadratischen Fehler der Mittelwerte der ermittelten Signalstärken von je mindestens zwei Blotsignalen. Die Signalstärken der Kontrollpflanzen wurden willkürlich auf einen relativen Signalstärkedurchschnittswert von 10 gesetzt, um einen Vergleich der voneinander unabhängig durchgeführten Northern-Analysen zu ermöglichen.(W_i = Wurzel-Gesamt-RNA, nitratinduziert)

Im Gegensatz dazu zeigen die Northern-Analysen mit RNA aus AM-kolonisierten und nicht-kolonisierten Tomatenwurzeln einen deutlichen Unterschied in der Expression des high-affinity Nitrattransportergens *Tomate-hi3*. Bei mykorrhizierten Wurzeln traten nach Hybridisierung mit der Antisense-RNA-Sonde hi3 (*Tomate-hi3*) stärkere Signale auf als bei den nicht-mykorrhizierten Wurzeln der Kontrollpflanzen. Die mit der RNA aus mykorrhizierten Wurzeln erhaltenen Signale sind etwa doppelt so stark wie die Signale mit isolierter RNA aus nicht-mykorrhizierten Kontrollwurzeln.
In Abhängigkeit von der RNA-Menge und der Auflagezeit des Chemilumineszenz-Films beim Nachweis der Signale besteht in der Regel zwischen der Menge der nachgewiesenen mRNA und der Signalstärke auf dem Film ein logarithmischer Zusammenhang. Daher kann der Unterschied zwischen der Konzentration der nachgewiesenen mRNA und der Signalintensität durchaus wesentlich größer sein als der Unterschied der gemessenen Signalintensitäten. Zur Quantifizierung dieses Unterschiedes wurden je 5, 10 und 20 µg RNA aus den Wurzeln von je vier mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen in einer weiteren Northern-Analyse mit der Sonde hi3 für das high-affinity Nitrattransportergen *Tomate-hi3* hybridisiert (Abb.35).

Abbildung 35: Quantifizierung der mit der Sonde hi3 für *Tomate-hi3* in der Northern-Analyse erhaltenen Signale



Legende zu Abbildung 35: Je 5, 10 und 20 µg RNA aus den Wurzeln von je vier mykorrhizierten (M) und nicht-mykorrhizierten (NM) Tomatenpflanzen wurden mit einer Dig-markierten Antisense-RNA-Sonde (hi3) für das high-affinity-Nitrattransportergen *Tomate-hi3* bei 68°C hybridisiert. Die über Chemilumineszenznachweis (4 h Auflagezeit) erhaltenen Signale wurden quantifiziert und gegen die eingesetzte RNA-Menge aufgetragen.
■: RNA aus den Wurzeln der nicht-mykorrhizierten Pflanzen (NM)
◆: RNA aus den Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen (M)

Aus den erhaltenen Daten kann abgelesen werden, daß innerhalb der gewählten Parameter (RNA-Menge, Sondenkonzentration, Auflagezeit, Filmentwicklungsdauer) eine möglicherweise nahezu lineare Abhängigkeit der Signalstärke zur eingesetzten RNA-Menge besteht. Dies bedeutet, daß die erhaltene Signalstärke mit der RNA aus mykorrhizierten

Wurzeln einer etwa um den Faktor zwei erhöhten Transkriptmenge im Vergleich zur RNA aus nicht-mykorrhizierten Wurzeln entspricht.

Tabelle 14:

n = 12	Gesamt	Arbuskel	Vesikel	Innenmyzel
Mykorrhizierte Pflanzen (M)	**78 ± 3**	**45 ± 8**	**67 ± 5**	**77 ± 3**
Nicht-mykorrhizierte Pflanzen (NM)	**4 ± 3**	**4 ± 2**	**4 ± 3**	**4 ± 4**

Legende zu Tabelle 14: Mykorrhizierung der zu Northern-Analysen eingesetzten 14 Wochen alten Tomatenpflanzen. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit je vier mykorrhizierten (M) und vier nicht-mykorrhizierten Pflanzen (NM). Bei den Fehlerwerten handelt es sich um den mittleren quadratischen Fehler des Mittelwertes. Der Mykorrhizierungsgrad wurde durch Auszählen der Pilzstrukturen an mit Lactophenolblau oder mit Tinte gefärbten Wurzelproben ermittelt. Färbung und Bonitur sind in Kapitel 2.1.7 beschrieben.

3.7 Expression von Nitratreduktase- und Nitritreduktasegenen von Tomate in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen

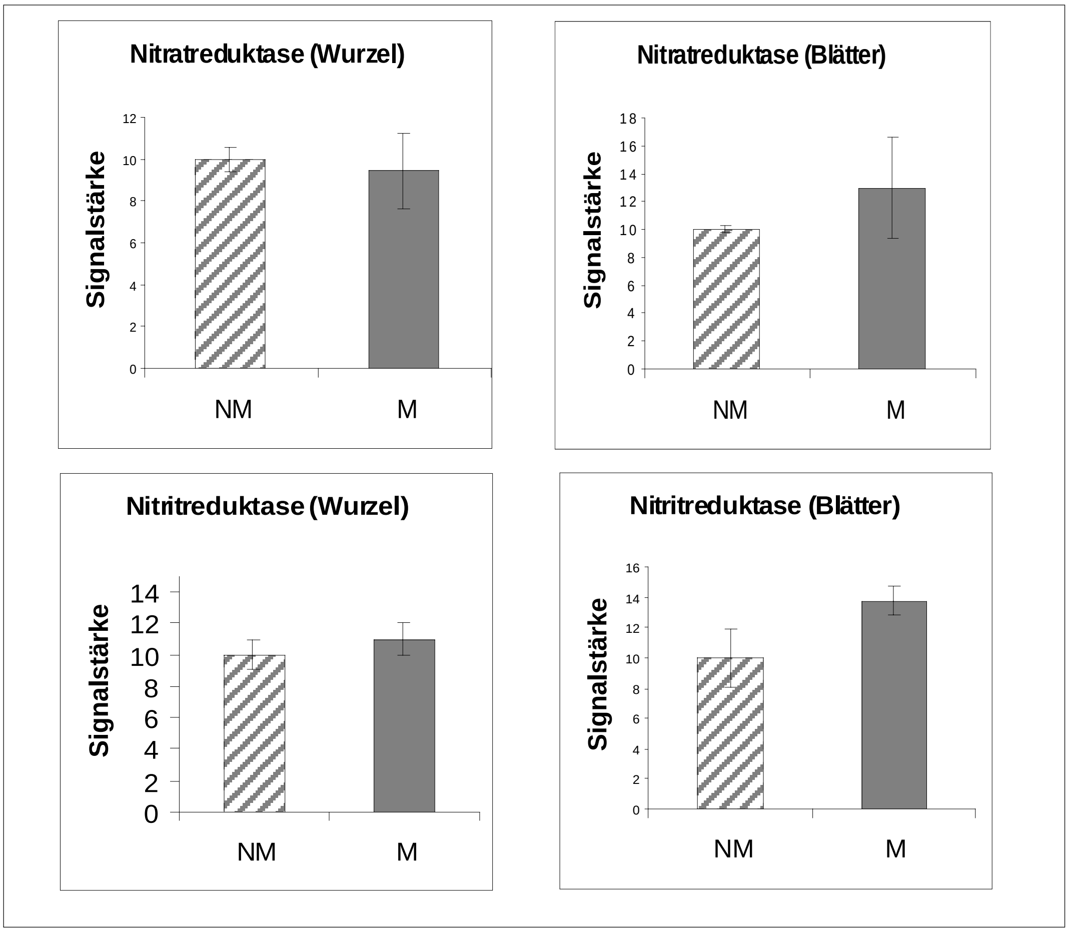
Zur Untersuchung der Expression pflanzlicher und pilzlicher Nitratreduktasegene sowie des Nitritreduktasegens von Tomate in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen wurden Northern-Analysen durchgeführt. Die Expression dieser Gene, die für die Enzyme der beiden den Nitrattransportern unmittelbar folgenden Schritte der Nitratassimilation kodieren, könnte Hinweise auf eine Beteiligung von *Glomus intraradices* an der assimilatorischen Nitratreduktion in mykorrhizierten Tomatenpflanzen liefern. Drei unabhängige Experimente mit RNA aus insgesamt 12 mykorrhizierten und 12 nicht-mykorrhizierten Pflanzen ergaben ähnliche Ergebnisse. In Abbildung 36 sind die erhaltenen Signalstärken zusammenfassend grafisch dargestellt
Mit der RNA aus Wurzeln von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten 14 Wochen alten Tomatenpflanzen lassen sich nach Hybridisierung mit den RNA-Sonden für die Nitratreduktase und einer Nitritreduktase aus Tomate keine statistisch signifikanten Unterschiede in den erhaltenen Signalstärken feststellen. Die aus Blättern von mykorrhizierten Tomatenpflanzen isolierte RNA führt im Vergleich zu RNA aus nicht-mykorrhizierten Pflanzen nach Hybridisierung mit der Antisense-RNA-Sonde für die Nitritreduktase aus Tomate zu um durchschnittlich etwa 30% stärkeren Hybridisierungssignalen. Die mit der Sonde für die Nitratreduktase aus Tomate erhaltenen Signale mit Blatt-RNA aus mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen weisen im Rahmen der Varianz keine deutlichen Unterschiede auf. In den Blättern der mykorrhizierten Pflanzen läßt sich eine statistisch nicht abgesicherte Tendenz zu einer leicht erhöhten Transkriptmenge des Nitratreduktase- und Nitritreduktasegens erkennen.

3.8 Expression des Nitratreduktasegens von *Glomus intraradices* Sy167 in mykorrhizierten Tomatenwurzeln

Mit der Antisense-RNA-Sonde (My46) für ein Nitratreduktasegen aus *Glomus intraradices* Sy167 (Kaldorf et al., 1994; Kaldorf et al., 1998) konnten Signale mit der RNA aus mykorrhizierten Tomatenwurzeln (>80% Mykorrhizierung) und mit der RNA aus Kontrollpflanzenwurzeln erhalten werden. Die Hybridisierungen zwischen der RNA aus mykorrhizierten Wurzeln und der *Glomus*-Sonde ergeben eindeutig stärkere Signale als die

Hybridisierungen mit der RNA aus den Wurzeln der Kontrollpflanzen. Nach densitometrischer Analyse und Normalisierung der Werte gegen die Signale der 18S-rRNA ergeben sich etwa fünfmal stärkere Signale mit der RNA aus mykorrhizierten Wurzeln (Abb.37).

Abbildung 36: Unterschiede in der Expression von Nitratreduktase- und Nitritreduktasegenen in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen

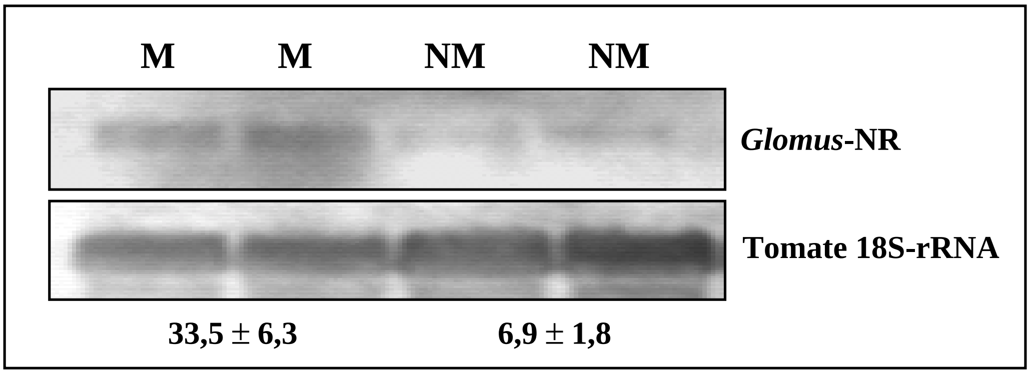


Legende zu Abb. 36: Aus Wurzeln und Blättern von 14 Wochen alten Tomatenpflanzen mit und ohne Kolonisierung mit *Glomus intraradices* Sy167 (M = mykorrhiziert, NM = Kontrollpflanze) wurde RNA isoliert. Die RNA wurde durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf HybondN-Nylonmembran (Amersham) übertragen. Die Filter wurden mit den spezifischen digoxigenin-markierten Antisense-RNA-Sonden T3-1 (Tomate-*NIA*), und TNir2-1 (Tomate-*NII*) bei einer Inkubationstemperatur von 68°C ü.N. hybridisiert. Der Chemilumineszenznachweis erfolgte wie in Kapitel 2.6.6 beschrieben. Nach Entfernung der hybridisierten nitrattransporterspezifischen Sonden erfolgte eine Hybridisierung mit einer Sonde für die 18S-rRNA aus Tomate. Die erhaltenen Signale wurden densitometrisch vermessen und mit den Signalen der 18S-rRNA normalisiert. Grafische Darstellung der Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittleren quadratischen Fehler der Mittelwerte der ermittelten Signalstärken von je mindestens zwei Blotsignalen pro Versuch. Die Signalstärken der Kontrollpflanzen wurden willkürlich auf einen relativen Signalstärkedurchschnittswert von 10 gesetzt, um einen Vergleich der voneinander unabhängig durchgeführten Northern-Analysen zu ermöglichen.

Daraus folgt, daß das *Glomus*-Nitratreduktasegen in mykorrhizierten Tomatenwurzeln transkribiert wird. In den Wurzeln der Kontrollpflanzen wurde nach Anfärbung der Pilzstrukturen (Kapitel 2.1.7.1) eine AM-Kolonisierung von nur etwa 1% festgestellt. Die etwa fünffach geringeren, mit der RNA aus Kontrollpflanzen erhaltenen Signale sind offenbar

auf eine Kreuzhybridisierung mit den Transkripten des Tomaten-Nitratreduktasegens zurückzuführen.

Abbildung 37:



Legende zu Abb. 37: Aus Wurzeln von 14 Wochen alten Tomatenpflanzen mit und ohne Kolonisierung mit *Glomus intraradices* Sy167 (M = mykorrhiziert, NM = Kontrollpflanze) wurde RNA isoliert. Die RNA (je 20 µg) wurde durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Hybond N-Nylonmembran (Amersham) übertragen. Die Filter wurden mit der spezifischen digoxigenin-markierten Antisense-RNA-Sonde My46 aus dem Nitratreduktasegen von *Glomus intraradices* bei einer Inkubationstemperatur von 68°C ü.N. hybridisiert. Der Chemilumineszenznachweis erfolgte wie in Kapitel 2.6.6 beschrieben. Nach Entfernung der hybridisierten My46-Sonde erfolgte eine Hybridisierung mit einer Sonde für die 18S-rRNA aus Tomate. Die erhaltenen Signale wurden densitometrisch vermessen und mit den Signalen der 18S-rRNA normalisiert. Die Signalstärken sind in relativen Einheiten angegeben. Als Fehler angegeben ist die auftretende Signalstärken-varianz von je zwei Signalbanden.

3.9 Bestimmung der Nitratreduktaseaktivität in Rohextrakten von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen sowie in Rohextrakten aus extra-radikalem Myzel (ERM) von *Glomus intraradices* Sy167

Zur Überprüfung einer möglichen Korrelation zwischen Enzymaktivität und den Signalen der Northern-Analysen wurde die NR-Aktivität von Wurzel- und Blattrohextrakten mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Tomatenpflanzen bestimmt. Aus den in Tabelle 15 dargestellten Meßergebnissen wird deutlich, daß in den Blattextrakten der mykor-rhizierten Tomatenpflanzen eine im Vergleich zu den Blattextrakten der Kontrollpflanzen leicht erhöhte NADH- und NADPH-abhängige Nitratreduktaseaktivität auftritt. In den Wurzelextrakten lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen erkennen. Unter den gewählten Anzuchtbedingungen treten sowohl bei der Expression des Nitratreduktasegens von Tomate in der Wurzel wie auch bei der Enzymaktivität von Wurzelextrakten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen auf. Allerdings könnte die bei den NR-Aktivitäten zu erkennende Tendenz einer erhöhten NR-Aktivität in mykorrhizierten Wurzeln auf die Aktivität der *Glomus*-Nitratreduktase zurückgeführt werden, sofern die in Northern-Analysen nach-gewiesenen Transkripte zur Bildung von aktiver *Glomus*-NR führen. Die Resultate der Northern-Analyse von Nitratreduktase-Transkripten in Blättern von mykorrhizierten Tomatenpflanzen zeigen einen ebenfalls statistisch nicht abgesicherten Trend zu einer leicht verstärkten Expression. Messungen der Nitratreduktase-Aktivität bestätigen diesen

Trend mit einer um etwa 10-20% höheren NR-Aktivität in den Blattextrakten der mykorrhizierten Pflanzen.

Tabelle 15:

Eingesetztes Material zur Herstellung von Rohextrakten n = 16 (für Wurzeln und Blätter) n = 6 für ERM	Mykorrhizierung Ø [%]	Spezifische NR-Aktivität [µmol/ g FW x h] **NADH**-abhängig	Spezifische NR-Aktivität [µmol/ g FW x h] **NADPH**-abhängig
Blätter, mykorrhizierte Pflanzen	**-**	**1.95** ± **0.11**	**1.89** ± **0.14**
Blätter, Kontrollpflanzen	**-**	**1.68** ± **0.09**	**1.47** ± **0.13**
Wurzeln, mykorrhizierte Pflanzen	**80**	**0.49** ± **0.10**	**0.33** ± **0.08**
Wurzeln, Kontrollpflanzen	**5**	**0.32** ± **0.11**	**0.23** ± **0.08**
Extraradikales Myzel (ERM) von *Glomus intraradices* Sy167		**1.13** ± **0.16**	**1.16** ± **0.20**

Legende zu Tabelle 15: Nitratreduktase-Aktivität (NRA) in den Extrakten aus 14 Wochen alten mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen (Kontrollpflanzen) sowie in Extrakten aus extraradikalem Myzel von *Glomus intraradices* Sy167 (isoliert aus dem Kompartiment-System). Die NRA wurde durch Messung der enzymatischen Umsetzung von Nitrat zu Nitrit mit NADH und NADPH als jeweiligem Elektronendonor bestimmt. Die NRA der Extrakte aus Pflanzenteilen wurde in zwei unabhängigen Versuchen mit je vier mykorrhizierten und vier nicht-mykorrhizierten Pflanzen mit vier Doppelproben pro Pflanze ermittelt. Die gewonnenen Daten für die NRA aus extraradikalem Myzel resultieren aus je zwei Doppelproben von Myzel aus Hyphen-Kompartimenten von drei Kompartimentsystemen. Bei den angegebenen Fehlerwerten handelt es sich um den mittleren quadratischen Fehler des Mittelwertes.

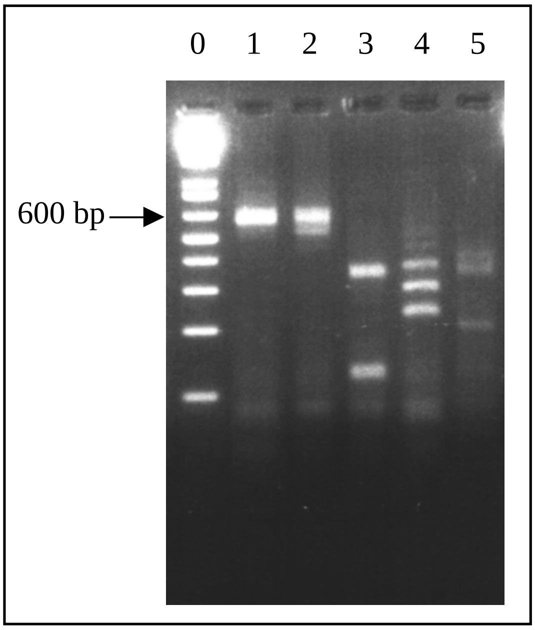
Bei den für mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Tomatenpflanzen erhaltenen Meßwerten fällt auf, daß die NADPH-abhängige NR-Aktivität stets nur wenig geringer ist als die entsprechende NADH-abhängige NR-Aktivität.
Die erhaltene NR-Aktivität in Rohextrakten des isolierten extraradikalen Myzels von *Glomus intraradices* liegt oberhalb der Meßwerte, die für Wurzelrohextrakte mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen ermittelten werden konnten. Zwischen der NADH- und der NADPH-abhängigen NR-Aktivität in Extrakten aus extraradikalen Hyphen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die erhaltenen Meßwerte zeigen deutlich, daß das extraradikale Myzel von *Glomus intraradices* Nitratreduktaseaktivität besitzt. Somit konnten erstmals, durch die Verwendung des Kompartiment-Kultursystems (siehe 2.1.6), NR-Aktivitäten des extraradikalen Myzels eines AM-Pilzes bestimmt werden.

3.10 RT-PCR-Nachweis von Nitratreduktasetranskripten mit RNA aus extraradikalem Myzel (ERM) von *Glomus intraradices* Sy167

Durch den Nachweis von Nitratreduktasetranskripten im extraradikalen Myzel von *Glomus intraradices* sollten die durch Enzymaktivitätsmessungen vorliegenden Daten zur Nitratreduktion von AM-Pilzen weiter bestätigt werden. Einige der als Teil des extraradikalen Myzels isolierten Sporen von *Glomus intraradices* Sy167 wurden, um sie molekular zu charakterisieren und zu identifizieren, einer Einzelsporen-PCR-RFLP-Analyse unterzogen (siehe Kapitel 2.3.4). Damit sollte sichergestellt werden, daß es sich tatsächlich um Material des Untersuchungsobjektes *Glomus intraradices* Sy167 handelte. Dabei konnte

für die aus dem Kompartimentsystem isolierten Sporen das in Abbildung 38 dargestellte für *Glomus intraradices* Sy167 typische Restriktionsmuster (Ouziad, 1999) erhalten werden.

Abbildung 38:

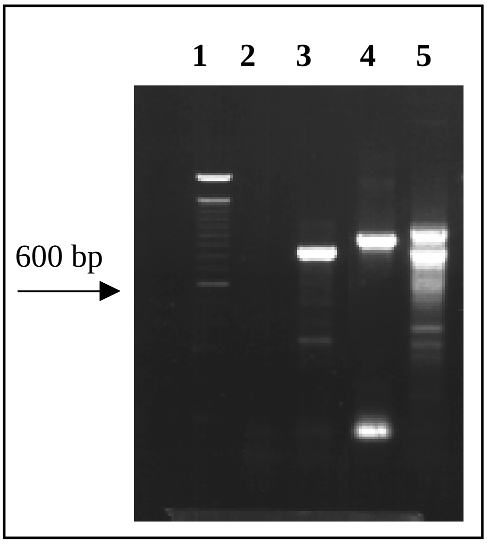


RFLP-Muster eines Einzelsporen-PCR-Produkts von *Glomus intraradices* Sy167, isoliert aus dem Kompartimentsystem. Verwendet wurden folgende Restriktionsenzyme:
Spur 0: 1 kb Plus-Längenstandard (Gibco),
Spur 1: *Alu*I, Spur 2: *BsU*RI, Spur 3: *Hin*fI,
Spur 4: *Hpa*II, Spur 5: *Taq*I
Eingesetzt wurden jeweils 8 µl des entsprechenden PCR-Produkts.
Die Auftrennung erfolgte auf einem 2% Agarosegel bei 10V/cm.

Nach der Erststrangsynthese mit isolierter Gesamt-RNA aus extraradikalem Myzel von *Glomus intraradices* mit dem Primer RACE1 konnten in einer nachfolgenden PCR-Reaktion unter Verwendung der Primerkombination FU3/FU4 (Kaldorf et al., 1998) Nitratreduktase-Transkripte nachgewiesen werden (Abb.39, Spur3).

Abbildung 39:

1: 100 bp-DNA-Leiter (Gibco)
2: 1µl DNase verdaute RNA
3: 1µl Erststrang (cDNA)
4: 100 ng Plasmid-DNA My46
5: 100 ng DNA aus extraradikalem Myzel



Legende zu Abbildung 39: RT-PCR-Experiment zur Expression von Nitratreduktasegenen in extraradikalem Myzel von *Glomus intraradices* Sy167. Die verwendete PCR-Methode mit der Primerkombination FU3/FU4 bestand nach 4 min Denaturierung bei 94°C aus zunächst zwei Zyklen mit einer Primerbindungstemperatur von 46°C, dann 38 Zyklen bei einer Primerbindungstemperatur von 52°C. Je 8 µl der PCR-Produkte wurden bei 10 V/cm mit einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

Mit der cDNA aus extraradikalem Myzel von *Glomus intraradices* wurde ein PCR-Produkt mit einer Hauptbande bei etwa 850 bp erhalten. In Spur 4 (My46 als PCR-Matrize) tritt das der Erwartung entsprechende 991 bp Amplifikat des von Kaldorf et al. (1998) klonierten Nitratreduktasegenteilbereiches aus *Glomus intraradices* auf. In dem PCR-Ansatz mit der isolierten genomischen DNA aus extraradikalen *Glomus*-Hyphen und -Sporen sind zwei Hauptamplifikatbanden bei etwa 850 bp und 1 kb zu beobachten. Die zur Kontrolle eingesetzte, DNase-verdaute RNA führte zu keinen sichtbaren PCR-Produkten (Spur 2). Das mit cDNA aus den extraradikalen Hyphen erhaltene 850 bp Hauptprodukt wurde kloniert und ansequenziert. Dabei konnten zwei unterschiedliche DNA-Sequenzen (siehe Anhang) erhalten werden, die nach Translation (NR1 und NR2) deutliche AS-Sequenzhomologien zu Nitratreduktasen aus Pilzen und Pflanzen aufweisen (Abb.40), jedoch nicht mit dem von Kaldorf et al. (1998) unter Verwendung der gleichen Primerkombination aus *Glomus intraradices* klonierten Genabschnitt (My46) übereinstimmen. Da es sich bei dem eingesetzten extraradikalen Myzel von *Glomus intraradices* um nicht-steriles Material handelte, ist eine Kontamination der isolierten Nukleinsäuren durch DNA und RNA anderer Organismen nicht völlig ausgeschlossen. Da eine sichere Zuordnung der erhaltenen Sequenzen zu ihrem Ursprungsorganismus nicht möglich ist, wurde auf die weitere Analyse der klonierten Genabschnitte verzichtet. In Abbildung 40 sind abgeleitete AS-Sequenzen von Teilbereichen der PCR-Produkte NR1 und NR2 den AS-Sequenzen der entsprechenden NR-Bereiche aus Ar*abidopsis thaliana*, *Aspergillus nidulans* und *Glomus intraradices* gegenübergestellt.

Abbildung 40:

```
NR1                   VFKRSNGFSWGPLPSTCATWTGVPLCELLSRCGVNMNDSDAPMQYV
NR2                   VVRKSKGFSWGAAGLSTALWTGVPIGALLRMAKPSR-----AAKYV
Glomus intraradices   MVRKSQGFSWGPAGVSTSLWTGPMLCDILALAKPDRRR---GARYV
Arabidopsis thaliana  MVKKSKGFNWGSAGVSTSVWRGVPLCDVLRRCGIFSRKG--GALNV
Aspergillus nidulans  TVRKSKGFSWGSAALSTALFTGPMMADIIKSAKPLRR-----ARYV
                          * *****          *                       *

NR1                   NFDGCDDLPKN 40%
NR2                   CFEGADKLPNG 60%
Glomus intraradices   CFEGGDTLPTG
Arabidopsis thaliana  CFEGSEDLPGG 60%
Aspergillus nidulans  CMEGADNLPNG 65%
                        *   **
```

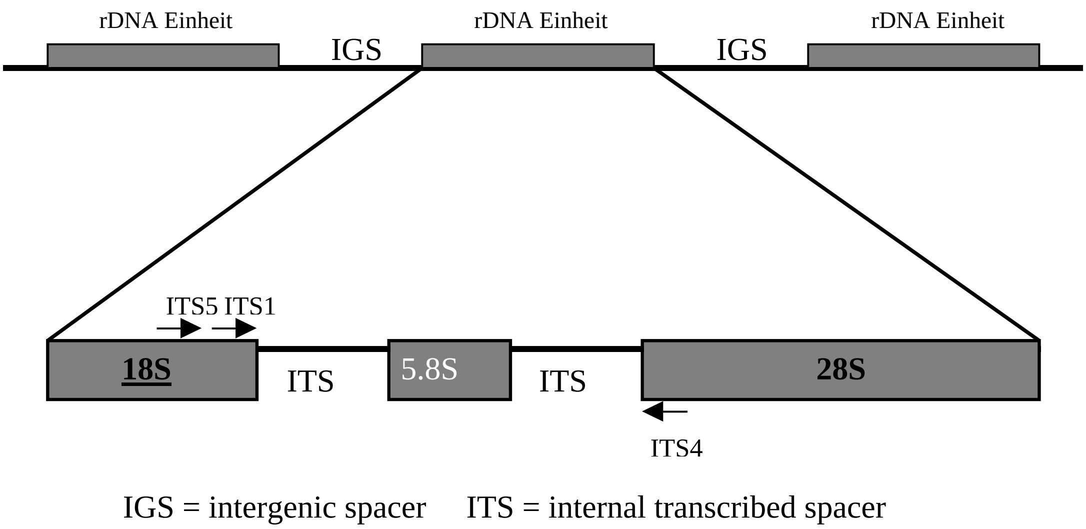
AS-Identität innerhalb der dargestellten AS-Sequenzabschnitte zur **NR von *Glomus intraradices*** (My46: Kaldorf et al., 1998)

Legende zu Abbildung 40: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen verschiedener NR-Segmente. Die Positionen, an denen identische AS auftreten, sind durch einen Stern gekennzeichnet. Die Sequenzen von *A. thaliana* (Crawford et al., 1988), *A. nidulans* (Johnstone et al., 1990) und *G.intraradices* (Kaldorf et al., 1998) sind der Literatur entnommen.

3.11 Einsatz einer rRNA-Sonde zur Abschätzung des rRNA-Anteils von *Glomus intraradices* Sy167 an der Gesamt-RNA mykorrhizierter Tomatenwurzeln

Die arbuskuläre Mykorrhiza besteht zu einem wesentlichen Teil aus einer sehr engen räumlichen Anordnung pilzlicher und pflanzlicher Zellen. Die quantitative Unterscheidung von pilzlicher und pflanzlicher RNA mykorrhizierter Wurzeln würde eine Normalisierung von Signalen spezifischer Transkripte ermöglichen. Eine exakte Normalisierung von Transkripten, die in der Symbiose vermindert oder verstärkt auftreten, war jedoch bisher nicht möglich.
Zu RNA-RNA-Hybridisierungsexperimenten mit RNA aus mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln wurde eine mit Digoxigenin markierte RNA-Antisense-Sonde (ITS1) aus der ITS-Region der rDNA aus *Glomus intraradices* (Abb. 41) eingesetzt. Diese Sonde umfaßt einen Bereich bestehend aus der 5,8S-rDNA und den flankierenden hochvariablen ITS (= **I**nternal-**T**ranscribed-**S**pacer)-Regionen und relativ kleinen Bereichen (jeweils etwa 20 bp) der pilzlichen 18S- und 28S-rDNA-Regionen.

Abbildung 41:



Legende zu Abb. 41: Schematische Darstellung der rDNA-Bereiche im Eukaryonten-Genom. Die rDNA-Bereiche liegen als „Tandem“-Wiederholungen („tandem repeats“) vor. Dabei werden die rDNA-Bereiche über sogenannte „intergenic spacer“ (IGS) voneinander getrennt. Innerhalb der rDNA-Bereiche sind Gene für die 18S-, 5,8S und 28S-rRNA lokalisiert. Die zwischen diesen Genen liegenden Bereiche werden als „internal transcribed spacer“ (ITS) bezeichnet.
Zur Amplifikation der ITS-Regionen mittels PCR wurden die spezifischen Oligonukleotidprimer ITS4 und ITS5 (White et al., 1990) eingesetzt.
Das Schema wurde modifiziert nach Lanfranco et al. (1998).

Die pilzlichen ITS-Regionen unterscheiden sich deutlich stärker von den pflanzlichen ITS-Bereichen als die relativ hoch konservierten 5,8S rDNA-Sequenzen bei Pflanzen und Pilzen. Bei den Hybridisierungen zwischen RNA aus mykorrhizierten und RNA aus nicht-mykorrhizierten Wurzeln mit der ITS-1-Sonde fiel auf, daß deutliche Unterschiede in der Signalstärke auftreten (Abb. 42). Mit der RNA aus mykorrhizierten Pflanzen konnten für die 5,8S-rRNA bis zu dreifach stärkere Signale im Vergleich zu RNA aus nicht-mykorrhizierten Pflanzen erhalten werden. Daraus folgt, daß die Kreuzhybridisierung zwischen pflanzlicher und pilzlicher ITS-Region, inklusive der 5,8S-rDNA, gering genug

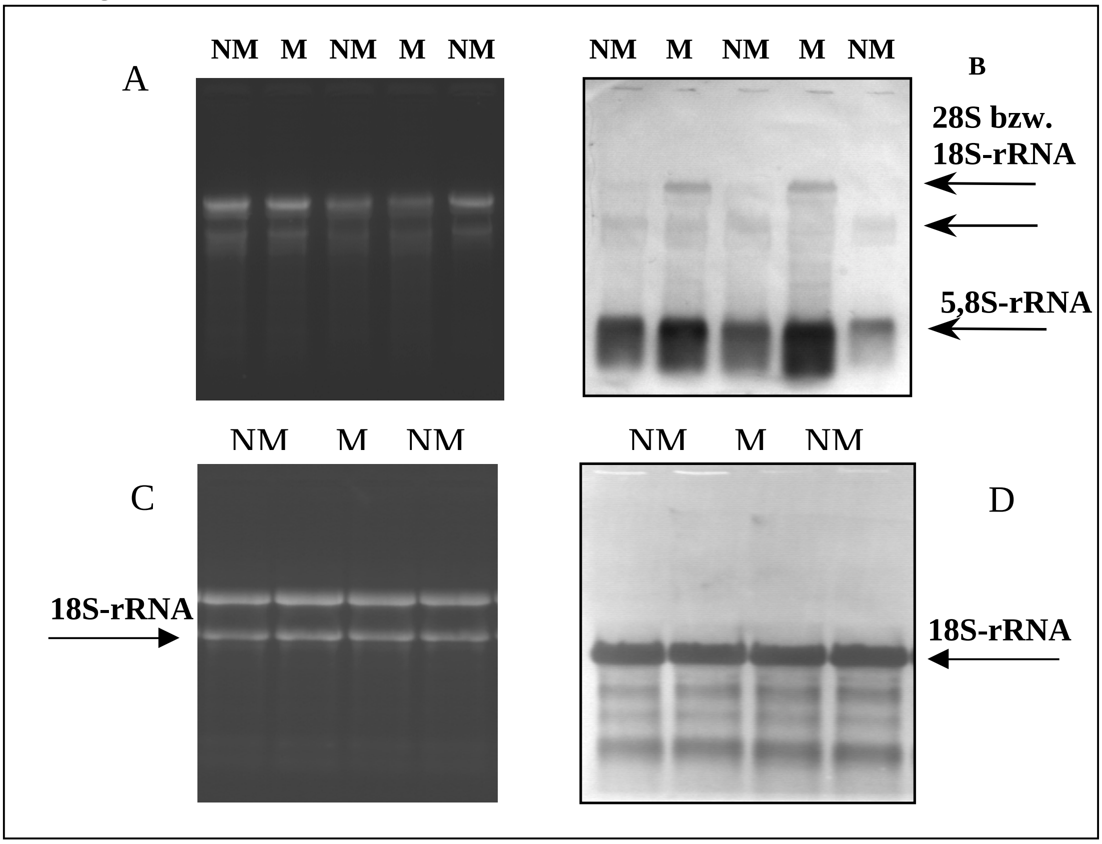
ist, um eine quantitative Differenzierung zwischen pilzlicher und pflanzlicher rRNA zu ermöglichen. Wegen der offensichtlich starken Kreuzhybridisierung mit der pilzlichen rRNA und dem möglichen Überschuß der pflanzlichen rRNA in der isolierten Gesamt-RNA aus mykorrhizierten Tomatenwurzeln, ist eine Differenzierung zwischen pilzlicher und pflanzlicher rRNA (Abbildung 42D) mit einer Sonde für die 18S-rRNA aus Tomate nicht möglich.

Unter der Voraussetzung eines konstanten rRNA-Anteils in der Gesamt-RNA des pilzlichen Symbiosepartners in extra- und intraradikalen Strukturen wurde versucht, eine Abschätzung des pilzlichen rRNA-Anteils in mykorrhizierten Tomatenwurzeln durchzuführen. Hierzu wurden RNA-Dot-Blot-Analysen mit der ITS-1-Sonde und isolierter Gesamt-RNA aus Hyphen und Sporen von *Glomus intraradices* sowie aus mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln durchgeführt.

3.11.1 RNA-Dot-Blot-Analysen zur Abschätzung des pilzlichen rRNA-Anteils an der Gesamt-RNA mykorrhizierter Tomatenwurzeln

Gesamt-RNA aus 12 Wochen alten mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen, sowie Gesamt-RNA aus Hyphen und Sporen von *Glomus intraradices* (gewonnen aus den Kompartiment-Systemen) wurde mit Hilfe einer Dot-Blotting-Apparatur (siehe Kapitel 2.6.4.2.1) in unterschiedlichen Verdünnungen auf eine BiodyneB-Nylonmembran transferiert und anschließend mit der ITS-1-Antisense-RNA-Sonde (Kapitel 3.11) hybridisiert. Dabei waren erhebliche Unterschiede bei den erhaltenen Signalstärken zwischen den einzelnen RNA-Spezies zu erkennen (Abb. 43).
Die RNA aus *Glomus intraradices* ergibt bei Hybridisierung mit der ITS-1-Sonde eindeutig die stärksten Signale gefolgt von den Signalen der RNA aus mykorrhizierten Tomatenwurzeln (Abb.43B). Zu deutlich schwächeren Signalen führt die Hybridisierung von ITS-1 mit RNA aus nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln. Subtrahiert man nun nach Quantifizierung der Signale die Meßwerte der RNA aus nicht-mykorrhizierten Wurzeln von den Werten der RNA aus mykorrhizierten Wurzeln, so sollten die erhaltenen Werte, im Vergleich zu den Meßwerten für die RNA aus *Glomus intraradices*, den Anteil pilzlicher rRNA in der RNA aus mykorrhizierten Wurzeln wiedergeben. Man erhält aus den vorliegenden Daten für den pilzlichen rRNA-Anteil an der Gesamt-RNA mykorrhizierter Tomatenwurzeln Werte von etwa 40-50%. Zur Überprüfung dieser Werte wurde Gesamt-RNA aus nicht-mykorrhizierten Wurzeln zu 25 und 50% mit *Glomus*-Gesamt-RNA (NMG25 und NMG50) und zusätzlich Gesamt-RNA aus mykorrhizierten Wurzeln mit 50% Glomus-Gesamt-RNA versetzt (MG50). Innerhalb eines nahezu linearen Bereiches der erhaltenen Kurven, die exponentiellen Sättigungskurven entsprechen (zwischen 1 und 10 ng RNA/Auftragungspunkt, in Abhängigkeit von der Auflagezeit beim Chemilumineszenznachweis), liegen die NMG25-Werte deutlich unterhalb der für die RNA aus mykorrhizierten Wurzeln erhaltenen Daten. Die NMG50-Werte hingegen überlappen im Rahmen der Varianz mit den Signalstärkedaten der RNA aus mykorrhizierten Wurzeln. Die für MG50 ermittelten Meßwerte liegen zwischen den Werten für die RNA aus *Glomus* und der RNA aus mykorrhizierten Wurzeln. Aufgrund dieser Daten läßt sich die Größenordnung des pilzlichen rRNA-Anteils in isolierter Gesamt-RNA aus mykorrhizierten Tomatenwurzeln (73% Mykorrhizierung) mit 40-50% bestätigen.

Abbildung 42:



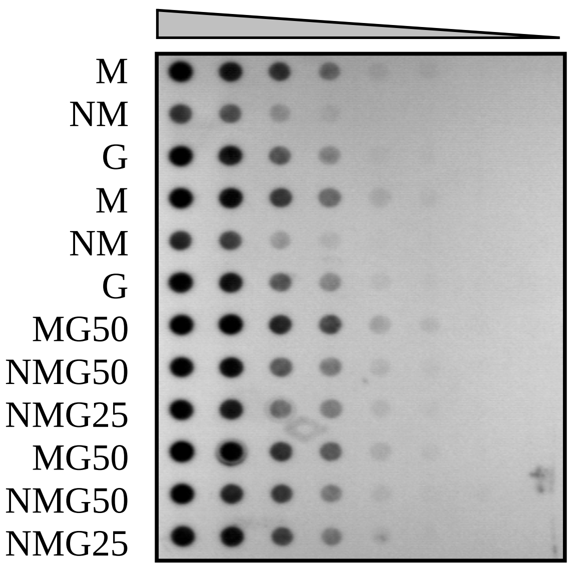
Legende zu Abb.42: Darstellung von Signalstärken bei der Hybridisierung von Gesamt-RNA aus mykorrhizierten (M) und nicht-mykorrhizierten (NM) Tomatenwurzeln mit der Sonde ITS-1, die die beiden ITS-Regionen und das 5,8S rRNA-Gen aus *Glomus intraradices* Sy167 umfaßt (Abbildung 42B), sowie mit einer Sonde für einen Teilbereich des 18S-rRNA-Gens aus Tomate (Abb. 42 D). Die RNA (20 µg/Spur) wurde durch Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 42 A und C) und auf BiodyneB-Membran transferiert. Die Filter wurden anschließend mit jeweils einer der mit Digoxigenin markierten Antisense-RNA-Sonden hybridisiert.
Der Nachweis der Hybridisierungssignale erfolgte kolorimetrisch.

Abbildung 43: RNA-Dot-Blot-Analyse mit RNA aus *Glomus intraradices* Sy167, mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln

A:

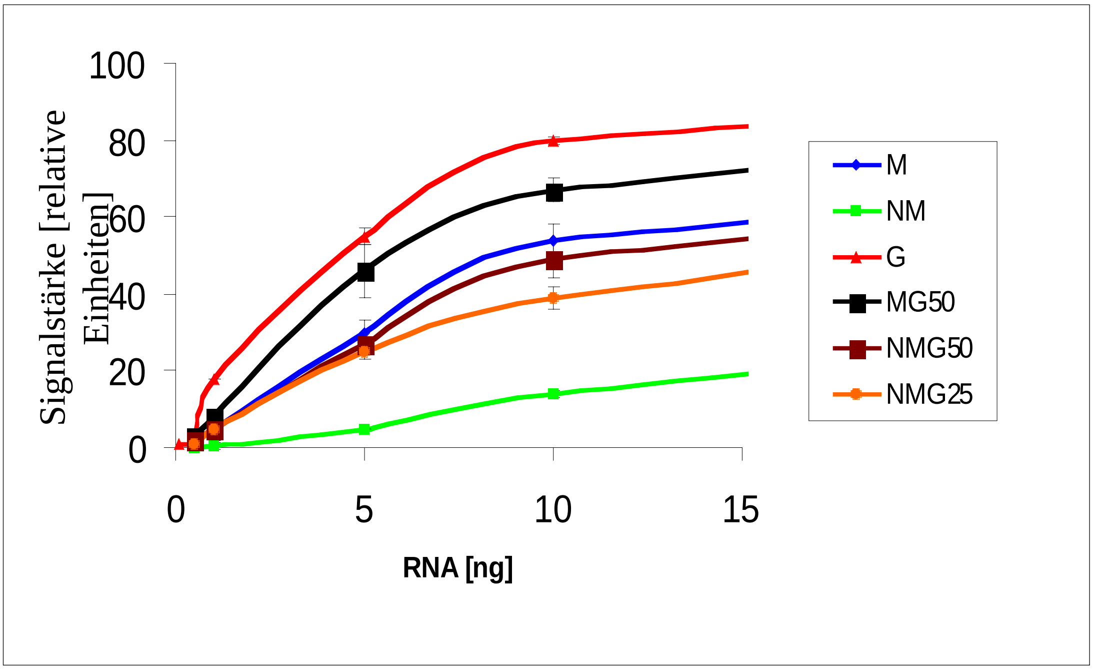
M: Tomatenwurzel-RNA
NM: Tomatenwurzel-RNA <u>nicht mykorrhiziert</u>
G: *Glomus*-RNA (Kompartiment-System)

MG50: M + 50% G
NMG50: NM + 50% G
NMG50: NM + 25% G



Fortsetzung Abbildung 43:

B:



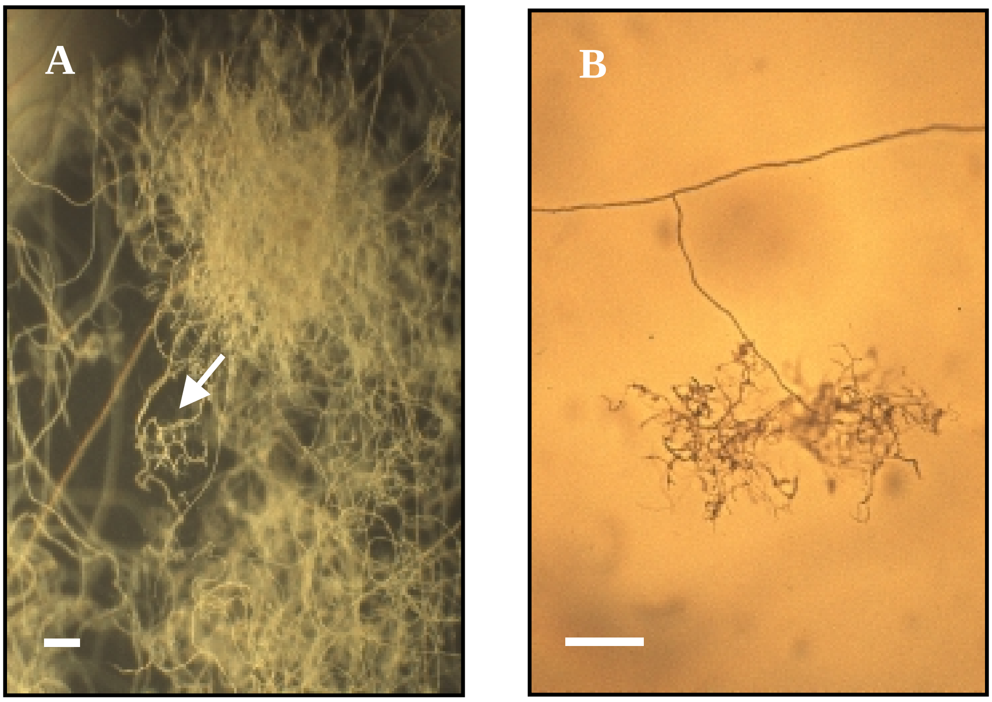
Legende zu Abbildung 43: Gesamt-RNA zwölf Wochen alter mykorrhizierter (73%) und nicht-mykorrhizierter (0%) Tomatenwurzeln wurde in folgenden Mengen mittels einer Dot-Blotting-Apparatur auf eine BiodyneB-Nylonmembran transferiert: 100, 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05 ng RNA. Die aus Hyphen und Sporen von *Glomus intraradices* Sy167 isolierte Gesamt-RNA wurde in absteigender Reihe wie folgt aufgetragen: 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 ng RNA. Es wurden jeweils Doppelproben auf eine Membran aufgetragen Die anschließende Hybridisierung mit der ITS-1-Antisense-RNA-Sonde erfolgte ü.N. bei 68°C. Zum Chemilumineszenznachweis waren 3 min Auflagezeit ausreichend. A: Signale nach Chemilumineszenznachweis. B: Graphische Darstellung der Signalstärken nach Quantifizierung mit dem Programm NIH Image 1.61. Die angegebenen Fehlerbalken geben die Varianz innerhalb der jeweiligen Doppelproben auf einer Membran wieder.

3.12 Wachstum von AM-Pilzen ohne Wirt

Mit Hilfe des Kompartimentsystems, das die schonende Isolierung von extraradikalem Myzel von AM-Pilzen erlaubt, wurden Sporen von *Glomus intraradices* gewonnen. Diese wurden oberflächensterilisiert und keimten, nach Übertragung auf ein modifiziertes Kulturmedium (siehe Kapitel 2.1.4.2), innerhalb von ein bis zwei Wochen aus. Dazu wurden etwa 50, zum Teil noch durch Hyphen verbundene Sporen, auf eine Petrischale mit Kulturmedium überführt. Die Ausbildung des Keimschlauches erfolgte dabei stets aus dem bestehenden Hyphenansatz heraus. Bei einem Großteil der so angesetzten Petrischalen war etwa zwei bis drei Wochen nach der Übertragung der Sporen auf das Kulturmedium eine reproduzierbar auftretende Kontamination mit schleimig-weiß erscheinenden Bakterien direkt an den ausgekeimten Sporen zu beobachten. Dabei handelt es sich vermutlich um von der Oberflächensterilisierung nicht abgetötete Bakterien, die möglicherweise innerhalb der Sporenwand lokalisiert waren (Walley und Germida, 1996). Diese Kontamination hatte jedoch keinen negativen Einfluß auf das Wachstum der Pilzhyphen. Zunächst wurden nur wenige lange Hyphen (einige cm), sogenannte „Runner“-Hyphen, ohne sichtbare Verzweigungen ausgebildet. Nur bei den Ansätzen, die mit Bakterien kontaminiert waren, konnte nach etwa 8 Wochen ein verstärktes Wachstum mit intensiver Verzweigung der

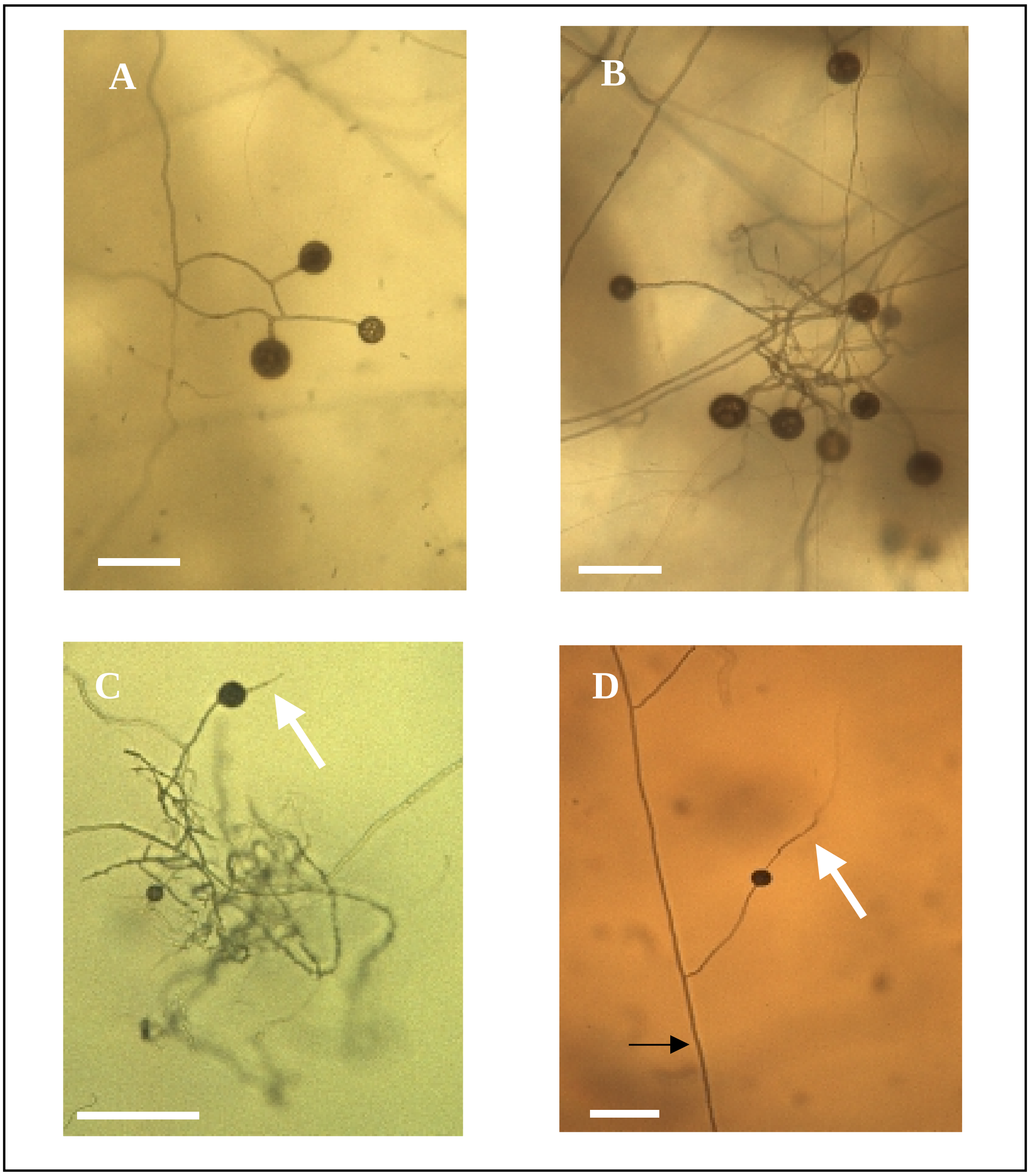
Hyphen beobachtet werden (Abb. 44A). Bei einigen der Hyphen traten bläschenartige Anschwellungen auf, die sich zu sporenähnlichen Strukturen entwickelten (Abb.45). Zu Beginn der Entwicklung war die Hyphe unmittelbar hinter einer solchen Anschwellung (apikale Hyphe) deutlich septiert. Die Sporen entstehen also nicht terminal sondern interkalar. In diese Schwellung der Hyphe werden im weiteren Verlauf der Entwicklung als kleine Tröpfchen sichtbare Lipide eingebracht.
Darüber hinaus werden stark verzweigte, an Arbuskeln erinnernde Strukturen (ALS = arbuscule-like-structures = Arbuskel-ähnliche-Strukturen), die oftmals mit neugebildeten Sporen assoziiert vorliegen, ausschließlich in den mit Bakterien kontaminierten Ansätzen ausgebildet (Abb.44B). Diese ALS werden dabei oftmals in nahezu gleichbleibenden Abständen an den sogenannten „Runner-Hyphen" (weit ins Medium hineinwachsende Hyphen) gebildet (Abb.46C). Die anfänglich beobachtete starke Apikaldominanz der „Runner-Hyphen" terminierte in Anwesenheit der Bakterien in tannenbaumartigen ALS (Abb.46B). Einige Wochen nach ihrer Ausbildung traten in einigen Hyphen der ALS Septen auf, die möglicherweise auf einen degenerativen Prozeß hindeuten, wie er auch bei Arbuskeln zu beobachten ist (Toth und Miller, 1984).
In den Ansätzen, die nicht mit Bakterien kontaminiert waren, wurden zunächst „Runner-Hyphen" von wenigen cm Länge gebildet, die sich im weiteren zeitlichen Verlauf ebenfalls stärker verzweigten. Nach etwa zehn Wochen konnten jedoch auf diesen Platten keine weiteren Veränderungen bezüglich fortgesetzten Wachstums oder stärkerer Verzweigung der Hyphen oder Sporenbildung festgestellt werden (Abb.46D-F).

Abbildung 44:



Legende zu Abbildung 44: AM-Strukturen in Agarplatten etwa sieben Monate nach der Keimung von oberflächensterilisierten Sporen von *Glomus intraradices* Sy167 ohne Anwesenheit einer Wirtswurzel, aber mit kontaminierenden Bakterien:
A: Hyphennetzwerk mit Arbuskel-ähnlichen Strukturen (Pfeil)
B: Arbuskel-ähnliche Struktur
Der in der unteren Bildecke eingeblendete Balken =100 µm.

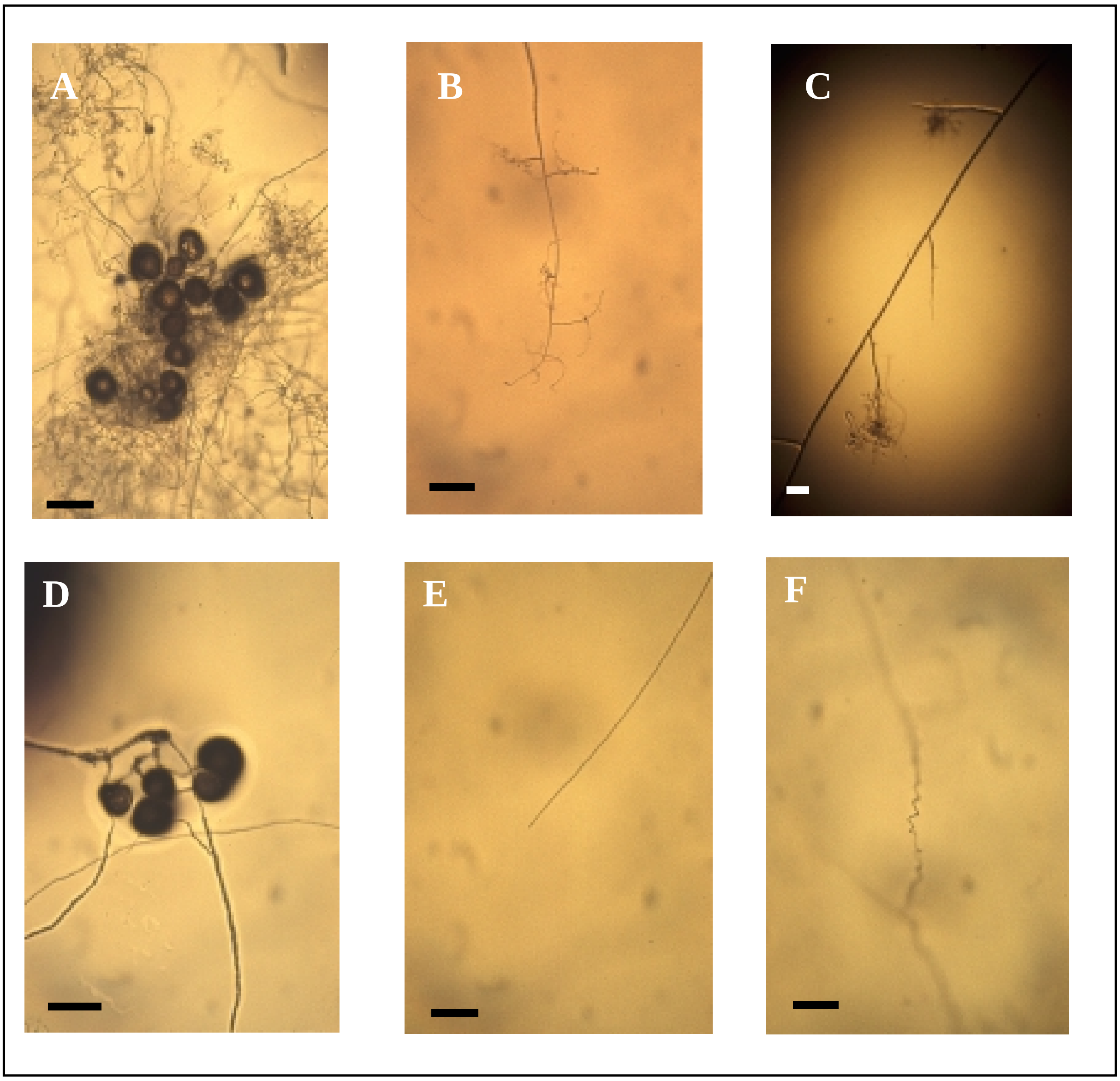
Abbildung 45:



Legende zu Abbildung 45: AM-Pilz-Strukturen in Agarplatten etwa fünf bis sieben Monate nach der Keimung von oberflächensterilisierten Sporen von *Glomus intraradices* ohne Anwesenheit einer Wirtswurzel, aber mit kontaminierenden Bakterien:
A und B: Neugebildete Sporen
C und D: Neugebildete Sporen (apikale Hyphe durch Pfeil markiert)
C: Mit ALS assoziierte Sporenbildung; D: Sporenbildung an einer „Runner"-Hyphe (schwarzer Pfeil)

Der in der unteren Bildecke eingeblendete Balken =100 µm.

Abbildung 46:

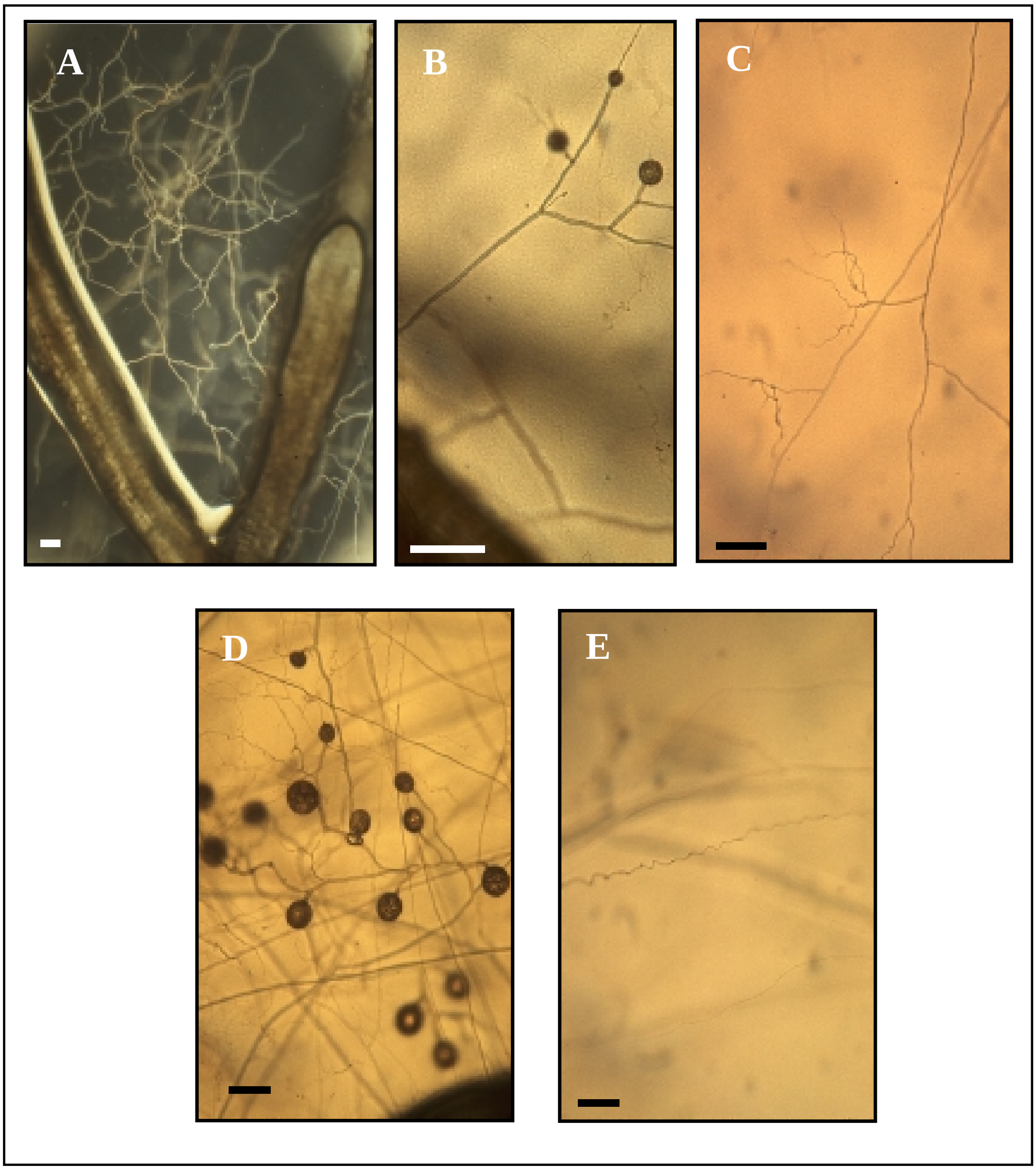


Legende zu Abbildung 46: AM-Pilz-Strukturen in Agarplatten etwa drei Monate nach der Keimung von oberflächensterilisierten Sporen von *Glomus intraradices* ohne Anwesenheit einer Wirtswurzel.

A: Ausgangssporen **mit** bakterieller Kontamination
B: Apex einer „Runner"-Hyphe **mit** bakterieller Kontamination
C: Anordnung von ALS an einer „Runner-Hyphe" **mit** bakterieller Kontamination
D: Ausgangssporen **ohne** bakterielle Kontamination
E: Apex einer „Runner"-Hyphe **ohne** bakterielle Kontamination
F: Typisch schraubenartig gewundene Hyphe **ohne** bakterielle Kontamination

Der jeweils in der unteren Bildecke eingeblendete Balken =100 µm.

Abbildung 47:



Legende zu Abbildung 47: AM-Kultur mit Ri-T-DNA transformierten Karottenwurzeln.
A: Extraradikales Myzel von *Glomus intraradices* Sy167
B: Sporenbildung etwa 8 Wochen nach Keimung der ausgelegten oberflächensterilisierten Sporen von *Glomus intraradices* Sy167
C: Arbuskel-ähnliche Struktur (mit Pfeil markiert)
D: Neugebildete Sporen 3 Monate nach Keimung der ausgelegten oberflächensterilisierten Sporen von *Glomus intraradices* Sy167
E: Schraubenartig gewundene Hyphe

Der in der unteren Bildecke eingeblendete Balken entspricht einer Länge von 100 µm.

Beim AM-Karottenwurzel-System (Becard et al., 1988) werden AM-Pilzstrukturen in einer symbioseähnlichen Situation mit in ihrem Wachstum nicht limitierten Ri T-DNA transformierten Karottenwurzeln, die als Wirtsmatrix dienen, ausgebildet. Eine Gegenüberstellung der extraradikalen Pilzstrukturen des Karottenwurzelsystems mit den auf den Agarplatten mit bakterieller Kontamination ohne Anwesenheit eines Wirtes gebildeten pilzlichen Strukturen sollte näheren Aufschluß über die Vergleichbarkeit der dort auftretenden Strukturen liefern. Da in der Literatur nur sehr wenig Bildmaterial der im Karottenwurzelsystem auftretenden AM-Strukturen für einen solchen Vergleich vorhanden war, wurde das Karottenwurzel-AM-Kultursystem mit *Glomus intraradices* Sy167 etabliert.
In Kombination mit Karottenwurzeln war unmittelbar nach der Keimung der Sporen (nach etwa 1-2 Wochen) ein intensives Wachstum mit stark verzweigenden Hyphen zu beobachten (Abb. 47A). Nach weiteren zwei Wochen traten auch hier bläschenartige Hyphenanschwellungen auf, die sich innerhalb einer Woche zu mit bloßem Auge erkennbaren Sporen entwickelten (Abb. 47B und 47D). Knäuelartig stark verzweigende Arbuskel-ähnliche Strukturen (ALS), wie bei den mit Bakterien kontaminierten Platten ohne Karottenwurzeln, konnten nicht beobachtet werden. Die im Karottenwurzelsystem ausgebildeten ALS sind zwar ebenfalls stärker verzweigt (Abb. 47C), zeigen aber nicht die typisch knäuelartig-knotige Struktur, die in Kombination mit den kontaminierenden Bakterien auftritt (Abb. 44B).
Typisch schraubenartig im Agar-Medium verdrehte Hyphen treten sowohl bei der Karottenwurzel-AM-Kultur und bei den nicht mit Bakterien kontaminierten ausgekeimten Sporen recht häufig auf. Diese Wuchsform war hingegen bei den mit Bakterien kontaminierten Ansätzen kaum zu beobachten (Abb. 46F und 47E).

Tabelle 16: Sporendurchmesser neugebildeter Sporen von *Glomus intraradices* Sy167

Sporendurchmesser [µm] ± Standardabweichung	Karottenwurzel-system	bakterielle Kontamination
Ausgangssporen	**73 ± 15**	**73 ± 15**
neugebildet, nach 3 Monaten	**62 ± 15**	**20 ± 10**
neugebildet, nach 5 Monaten	**n.b.**	**34 ± 9**
neugebildet, nach 9 Monaten	**n.b.**	**53 ± 8**

Die Größe der in beiden Systemen gebildeten Sporen wurde als weiterer Vergleichsparameter herangezogen (Tabelle 16). Die Anzahl der neugebildeten Sporen ließ sich aufgrund der die Oberfläche des Agars teilweise bedeckenden bakteriellen Biomasse nicht bestimmen. Da viele der untersuchten Platten nach etwa sechsmonatiger Inkubation schon deutliche Austrocknungserscheinungen aufwiesen, ist ein direkter Vergleich, der in ihrer zeitlichen Entwicklung unterschiedlichen Kultursysteme nicht möglich. In den Platten mit Karottenwurzeln erreichen die neugebildeten Sporen schon nach etwa 3 Monaten einen mit den Ausgangssporen vergleichbaren Durchmesser. Die ohne Anwesenheit von Wurzeln, d.h. nur mit bakterieller Kontamination neugebildeten Sporen, sind nach 3 Monaten Inkubation um mindestens 60% kleiner als die in der Kultur mit den transformierten Karottenwurzeln herangewachsenen Sporen. Auch nach 9 Monaten Kultur erreichen die ohne Wurzel-Co-Kultur gebildeten Sporen von *Glomus intraradices* nicht den durchschnittlichen Durchmesser der Ausgangssporen.
Zur Überprüfung der Vitalität und Reinfektiosität der ohne Wirtswurzel aber mit bakterieller Kontamination gebildeten Sporen wurden erste Inokulationsversuche mit

Tomatenpflanzen durchgeführt. Hierzu wurden einzelne Sporen aus dem Agar herauspräpariert (etwa 10 pro Ansatz) und in unmittelbarer Nähe eines keimenden Tomatensamens in einen mit Lecaton und Einheitserde gefüllten Topf überführt (Kap. 2.1.6). Nach 8 Wochen Kultur wurden die Pflanzen geerntet und die Wurzeln auf eine Mykorrhizierung untersucht. In keinem der zehn angesetzten Töpfe war es zur Ausbildung einer Symbiose zwischen den eingesetzten Sporen von *Glomus intraradices* Sy167 und Tomate gekommen.

4. Diskussion

4.1 Eigenschaften der zur Herstellung von Gensonden amplifizierten Bereiche aus Nitrattransporter-, Nitratreduktase- und Nitritreduktasegenen

Aus höheren Pflanzen sind zwei unterschiedliche Nitrattransporter-Genfamilien bekannt, die, grob betrachtet, für low-affinity Nitrattransporter und high-affinity Nitrattransporter kodieren. Ziel der in Kapitel 3.1 beschriebenen PCR-Experimente war die Gewinnung von Gensonden, die zur Untersuchung der Expression an der Nitratassimilation beteiligter Gene in der arbuskulären Mykorrhiza eingesetzt werden sollten. Insbesondere sollten dabei Sonden für verschiedene Nitrattransportergene sowie für Nitrat- und Nitritreduktasegene aus Tomate entwickelt werden. Zu Beginn der Versuche waren vier Sequenzen von Mitgliedern der low-affinity und drei Sequenzen von Mitgliedern der high-affinity Nitrattransporterfamilien aus höheren Pflanzen publiziert (siehe Kapitel 3.1). Die Sequenz für das Strukturgen der assimilatorischen Nitratreduktase von Tomate war ebenfalls bereits veröffentlicht (Daniel-Vedele et al., 1989). Eine Nitritreduktasesequenz aus Tomate lag nicht vor.

Zunächst sollten auch Sonden für Nitrattransportergene aus *Glomus* entwickelt werden. Ausgehend von den wenigen Sequenzinformationen zu Nitrattransportergenen von Pilzen wurden degenerierte Primer entwickelt, die jedoch in keinem Fall zur Amplifizierung eines Gensegmentes führten, das Homologien zu den beiden bekannten Nitrattransportergenen aus *Aspergillus nidulans* und *Pichia angusta* aufwies. Daher konnte dieses Vorhaben im weiteren nicht realisiert werden.

Vergleiche der vorliegenden Nitrattransporter-Sequenzdaten von höheren Pflanzen machen deutlich, daß innerhalb der beiden Nitrattransporterfamilien konservierte Bereiche vorliegen, die die Entwicklung von degenerierten Oligonukleotidprimern zur Amplifizierung eines entsprechenden Segmentes aus low- und high-affinity Nitrattransportergenen von verschiedenen höheren Pflanzen ermöglichen sollten. Mit den ausgewählten Primern konnten Segmente von low-affinity-Nitrattransportergenen aus *Arabidopsis* und Tomate sowie Segmente von high-affinity-Nitrattransportergenen aus *Arabidopsis*, Tomate und Tabak amplifiziert werden. Die eingesetzten Primerpaare sind demnach zur Amplifizierung von Teilsequenzen aus low- und high-affinity Nitrattransportergenen verschiedener Organismen geeignet. Allerdings konnten mit isolierter DNA aus Mais keine spezifischen Amplifikate erhalten werden. Das Fehlen von spezifischen Amplifikaten in den PCR-Produkten mit Mais-DNA könnte zufallsbedingt oder auf eine zu große Distanz zwischen den beiden Primern, möglicherweise durch das Vorliegen von langen Intronsequenzen im zu amplifizierenden Bereich, zurückzuführen sein. Weitere mögliche Ursachen, die eine effiziente Primerbindung verhindern könnten, wären Introngrenzen innerhalb der Primerzielsequenzen oder abweichende Sequenzen in Primerbindungsbereich. Die in nahezu allen PCR-Produkten auftretenden, unspezifischen Amplifikate sind vermutlich auf die Verwendung von degenerierten Primern, relativ niedrigen Primerbindungstemperaturen und die hohe Zyklenzahl der PCR-Reaktionen zurückzuführen.

Das Primerpaar PNT1/PNT2 wurde zur Amplifizierung von Segmenten aus low-affinity Nitrattransportergenen von Tomate eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte führten bei Hybridisierung mit einer Sonde aus *Arabidopsis-lo1* zu verschiedenen Hybridisierungssignalen (Abb. 9). Die zu den stärksten Signalen führende Amplifikatbande konnte kloniert und als Segment des low-affinity Nitrattransportergens *Tomate-lo1* (Lauter et al., 1996) identifiziert werden. Vermutlich weisen die weiteren signalgebenden Banden ebenfalls eine entsprechende Sequenzhomologie zu *Arabidopsis-lo1* auf. Das Ansequenzieren der stets zu Hybridisierungssignalen führenden 490 bp Amplifikatbande zeigte aber, daß innerhalb des sequenzierten Bereiches (300 bp) keine signifikanten Sequenzhomologien zu

low-affinity Nitrattransportergenen auftraten. Vermutlich besteht daher eine Region des nicht-sequenzierten Amplifikatbereiches aus einer zu *Arabidopsis-lo1* ähnlichen DNA-Sequenz.
Beim Sequenzvergleich der mit DNA aus *Arabidopsis* erhaltenen PCR-Amplifikate A3-1 und A3-29 mit bereits publizierten high-affinity Nitrattransportersequenzen wird deutlich, daß A3-1 mit hoher Wahrscheinlichkeit Segment eines bisher nicht bekannten, zu high-affinity Nitrattransportern homologen Gens und A3-29 Teilbereich von *Arabidopsis-hi2* (Zhou et al., 1999) ist. Die 84% DNA-Sequenzidentität der erhaltenen Insertteilsequenzen des Klons A3-1 zu einem genomischen Klon von Chromosom 5 (gbAB015472), in dem *Arabidopsis-hi3* und *Arabidopsis-hi4* enthalten sind, gibt einen Hinweis auf weitere zu high-affinity Nitrattransportergenen homologe Sequenzen im Genom von *Arabidopsis thaliana*, deren Existenz auch von Forde (2000) vermutet wird.
Der aus Tomate erhaltene Klon T1-6 weist in den sequenzierten Bereichen eine 99%ige DNA-Sequenzidentität zu *Tomate-hi1* und zu *Tomate-hi2* auf (Ono et al., 2000). Eine eindeutige Zuordnung von T1-6 zu einem dieser beiden Gene ist aufgrund der äußerst geringen Sequenzunterschiede zwischen *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* (nur 22 unterschiedliche Nukleotide im mutmaßlich translatierten Bereich der publizierten cDNA-Sequenzen; Ono et al., 2000) nicht möglich. Die wenigen Unterschiede in der ermittelten Sequenz von T1-6 zu den beiden high-affinity-Nitrattransportergenen *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* sind wahrscheinlich auf Fehler der Taq-DNA-Polymerase während der PCR-Amplifikation oder auf nicht zu erkennende Sequenzierfehler zurückzuführen. Beim Klon T1-7, dessen sequenzierte Insertbereiche sehr deutliche Unterschiede zu *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* aufweisen (nur 84% Sequenzidentität), handelt es sich daher wahrscheinlich um ein Segment eines bisher unbekannten zu high-affinity-Nitrattransportern homologen Gens von Tomate.
Aufgrund der hohen Homologien zu bekannten high-affinity Nitrattransportern und aus dem Vorhandensein des für die high-affinity Nitrattransporter-Familie charakteristischen AS-Sequenzmotivs A/G-G-W/L-G-N-M-G in der mutmaßlichen Transmembrandomäne 5 (Trueman et al., 1996) ergibt sich die Zugehörigkeit der erhaltenen Klone aus *Arabidopsis* und Tomate zur high-affinity Nitrattransporter-Familie innerhalb der MFS (major facilitator superfamily)-Membrantransporter-Familie. Dieses typische Sequenzmotiv tritt ebenso bei Genprodukten weniger eng verwandter Organismen wie bei dem Nitrattransporter CRNA aus *Aspergillus nidulans* (Unkles et al., 1991), den high-affinity Nitrattransportern NAR-3 und NAR-4 aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Quesada et al., 1994) und NARK aus *E.coli* (Noji et al., 1989) auf. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Sequenzmotiv um ein für Nitrat/Nitrit-Transporter spezifisches Motiv innerhalb der MFS (Trueman et al., 1996).
Für die assimilatorische Nitritreduktase aus höheren Pflanzen lag eine Vielzahl von Sequenzen in den Datenbanken vor. Der Vergleich dieser Sequenzen erlaubte die Entwicklung von degenerierten Primern, die die Amplifizierung eines Segments aus einem Nitritreduktasegen aus Tomate ermöglichte. Aus heterologen Southern-Analysen von Migge et al. (1998) kann geschlossen werden, daß im Tomatengenom mindestens zwei Nitritreduktasegene existieren, die möglicherweise für die Expression zweier unterschiedlicher Isoenzyme in den Blättern bzw. Kotyledonen verantwortlich sein könnten (Kutscherra et al., 1987; Migge et al., 1998).
Bei der PCR-Amplifizierung des NiR-Gensegmentes aus Tomate wurde allerdings aus Wurzeln gewonnene cDNA eingesetzt. Somit handelt es sich beim Klon TNiR2-1 um ein Segment eines Nitritreduktasegens aus Tomate, das in Wurzeln transkribiert wird. Aufgrund der hohen Sequenzidentitäten der in Tabak vorkommenden Nitritreduktasegene (Kronenberger et al., 1993) ist eine heterologe Hybridisierung einer TNir2-1-Sonde mit den Transkripten des zweiten Tomaten-Nitritreduktasegens in Northern-Analysen wahrscheinlich.

Das Nitratreduktasegen von Tomate liegt hingegen in nur einer Kopie im haploiden Genom vor (Daniel-Vedele et al., 1989).
Aufgrund der relativ hohen Homologien zwischen T1-6 und T1-7 sowie zwischen *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2*, die eine Unterscheidung der Transkripte in Northern-Analysen erschweren würde, wurde mit sequenzspezifischen Primern versucht, die 3´-nicht-translatierten Bereiche der Transkripte von low- und high-affinity-Nitrattransportergenen aus Tomatenwurzel-cDNA zu klonieren (3´-RACE). In der Drittstrangsynthese des 3´-RACE tritt eine Vielzahl von Amplifikaten auf, bei denen es sich möglicherweise um Amplifikate verschiedener Transkripte oder um durch Verwendung der RACE-Primer verkürzte Amplifikate derselben Transkripte handelt. Darüber hinaus treten auch völlig unspezifische Produkte auf, wie aus Abbildung 30 (RACE mit oberirdischen Pflanzenteilen) zu entnehmen ist.
Das mit dem für T1-6 spezifischen Primer klonierte Transkriptende PNT5.6-1 entspricht auch im 3´-nicht-translatierten Bereich der Sequenz von *Tomate-hi2*. Die Plasmid-Insertsequenz PNT5.7-1, die mit dem für T1-7 spezifischen Primer erhalten wurde, ist ein von *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* eindeutig verschiedenes Transkriptende eines zu high-affinity Nitrattransportern homologen, in Tomatenwurzeln exprimierten Gens. Dieses wurde aufgrund der deutlichen Homologien als *Tomate-hi3* bezeichnet. Durch RT-PCR-Experimente und anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte konnte gezeigt werden, daß es sich bei den Klonen PNT5.7-1 und T1-7 um Bestandteile desselben Gens, also von *Tomate-hi3*, handelt. Ono et al. (2000) hatten *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* aus einer wurzelhaar-spezifischen cDNA-Bank isoliert. Aus einer cDNA-Bank aus Wurzeln von ausgewachsenen Tomatenpflanzen konnten 70% der signalgebenden Klone als *Tomate-hi2*, aber 95% der Klone der Wurzelhaar-cDNA-Bank als *Tomate-hi1* identifiziert werden (Ono et al., 2000). Über die weiteren 30% der signalgebenden Klone aus der Gesamt-Wurzel-cDNA-Bank werden jedoch keine näheren Angaben gemacht. *Tomate-hi3* könnte daher Bestandteil dieser Subpopulation in der von Ono et al. (2000) verwendeten cDNA-Bank sein.
Die tatsächliche Funktion von *Tomate-hi3* als high-affinity-Nitrattransportergen müßte jedoch in zukünftigen Untersuchungen durch eine Expression des *Tomate-hi3*-Proteins in einem Nitrattransport-defizienten System überprüft werden. Hierzu würde sich die Injektion von *Tomate-hi3*-mRNA in *Xenopus*-Oocyten (Tsay et al., 1993; Miller und Zhou, 2000) und die heterologe Expression in Nitrattransporter-defizienten Hefemutanten anbieten. Voraussetzung für diese Experimente wäre allerdings eine vollständig klonierte cDNA von *Tomate-hi3*. Bisher sind etwa 50% der kodierenden DNA-Sequenz von *Tomate-hi3* bekannt.
Zur Überprüfung der erhaltenen RACE-Klone aus high-affinity Nitrattransportergenen wurden Southern-Hybridisierungen mit genomischer DNA aus Tomate durchgeführt. Die für *Tomate-hi2* erhaltenen Resultate entsprechen den von Ono et al. (2000) dargestellten Ergebnissen mit einer Sonde für *Tomate-hi2*. Bei Hybridisierung mit einer Sonde für *Tomate-hi3* tritt ein Hybridisierungsmuster auf, das von den mit Sonden für *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* erhaltenen Signalmustern (Ono et al., 2000) deutlich verschieden ist. Daraus folgt, daß im Genom von Tomate mit großer Wahrscheinlichkeit mindestens drei unterschiedliche, zu high-affinity Nitrattransportern homologe Gene existieren. Die high-affinity Nitrattransporter-Familie besteht in verschieden Pflanzenfamilien aus mehr als zwei Mitgliedern. So konnte duch eine Southern-Analyse mit geringer Stringenz für Gerste gezeigt werden, daß dort sieben bis zehn zu high-affinity Nitrattransportergenen homologe Sequenzen im Genom vorliegen (Trueman et al., 1996). Bislang wurden vier Mitglieder der high-affinity Nitrattransporter-Familie aus Gerste kloniert (Vidmar et al., 2000a). Aus *Arabidopsis* wurden mittlerweile ebenfalls drei weitere zu *Arabidopsis-hi1* homologe Gene identifiziert (Filleur und Daniel-Vedèle, 1999). Dabei gibt es deutliche Hinweise, daß je

zwei dieser Gene in *Arabidopsis* in entgegengesetzter Orientierung in geringem Abstand voneinander (wenige kb) auf demselben DNA-Strang lokalisiert sind (Zhuo et al., 1999; Forde, 2000). Ähnliches wird auch von Ono et al. (2000) für *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* aus Southern-Analysen, die nahezu identische Bandenmuster für *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* ergaben, geschlossen. In der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Southern-Analyse weist *Tomate-hi3* keine Ähnlichkeiten zum für *Tomate-hi2* erhaltenen Bandenmuster auf. Daher ist eine enge Kopplung mit *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* eher unwahrscheinlich.
Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob es sich bei der für *Arabidopsis* beschriebenen inversen Tandem-Anordnung der high-affinity Nitrattransportergene um ein generelles Organisationsprinzip handelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deutliche Hinweise auf weitere zu high-affinity-Nitrattransportergenen homologe Sequenzen im Genom von *Arabidopsis thaliana* erhalten.
Mit den für die beiden low-affinity Nitrattransporter aus Tomate spezifischen Primern konnte die cDNA der Transkriptenden von *Tomate-lo1* und von *Tomate-lo2* kloniert werden. Für *Tomate-lo2* wurde allerdings nur ein stark verkürztes Transkriptende erhalten (siehe Kapitel 3.1.6.2).
Die ausreichende Spezifität der mit Hilfe der RACE-Klone (zwischen 200-500 bp) hergestellten Hybridisierungssonden konnte durch einen Kreuzhybridisierungstest bestätigt werden (Kapitel 3.2).

4.2 *Tomate-lo1*, *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* sind durch Nitrat induzierbar

Innerhalb des high-affinity Nitrataufnahme-Systems konnten bislang nur Gene, die als Bestandteile des induzierbaren high-affinity Nitrataufnahme-Systems gelten, kloniert werden (Vidmar et al, 2000b). Daher kennt man von Komponenten des konstitutiv exprimierten high-affinity Nitrataufnahme-Systems bisher nur ihre kinetischen Eigenschaften. Gut charakterisierte *Arabidopsis*-Mutanten (Wang und Crawford, 1996), die einen Defekt in ihrem konstitutiv exprimierten high-affinity Nitrataufnahme-System aufweisen, führten bislang nicht zur Klonierung eines entsprechenden Gens. Die Mutanten waren durch Mutagenese mit Ethansulfonsäuremethylester (EMS) erzeugt worden. Dies behindert die Identifizierung der für den Phänotyp verantwortlichen Mutation(en).
Bestandteile eines konstitutiven Nitrataufnahmesystems sind derzeit nur innerhalb des low-affinity Nitrataufnahme-Systems bekannt, so z.B. *Reis-lo1* (Lin et al., 2000) und *Arabidopsis-lo2* (Huang et al., 1999). Hierzu zählt aber nicht das erste aus höheren Pflanzen klonierte low-affinity Nitrattransportergen *Arabidopsis-lo1*(Tsay et al., 1993), dessen Produkt, ein Nitrattransporter mit dualer Affinität, sowohl an high- wie auch low-affinity Nitrattransport beteiligt ist (Liu et al., 1999).
Arabidopsis-lo1 besitzt nur etwa 40% Sequenzidentität zu *Reis-lo1* und *Arabidopsis-lo2*, die mit den Peptidtransportergenen *HvPTR1* aus Gerste (West et al., 1998) und *AtPTR2B* aus *Arabidopsis* (Frommer et al., 1994; Rentsch et al., 1995; Song et al., 1996) eine Subgruppe innerhalb der low-affinity Nitrattransporterfamilie bilden (Lin et al., 2000). Alle anderen bislang bekannten low-affinity-Nitrattransportergene, darunter auch *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2*, zeigen im Vergleich mit *Reis-lo1* weitaus höhere Sequenzidentitäten zu *Arabidopsis-lo1* (Lin et al., 2000).
Arabidopsis-lo1 und *Tomate-lo2* sind eindeutig nitratinduzierbar. Transkripte von *Arabidopsis-lo1* sind außerdem nur in Anwesenheit von Nitrat nachweisbar (Tsay et al., 1993; Huang et al., 1996). Innerhalb des low-affinity Nitrataufnahme-Systems existieren somit auch nitratinduzierbare Komponenten. (Lauter et al., 1996; Huang et al., 1996). Diese Eigenschaft von Mitgliedern der Nitrattransporter-Familien unterscheidet sie von anderen

Transportergenen, wie z.B. Phosphat- und Sulfattransportergene (Smith et al., 1997; Daram et al., 1998), die durch ihr Substrat nicht induziert werden.

Zur Überprüfung der Induzierbarkeit von *Tomate-lo1*, *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* durch Nitratgabe, wurden Northern-Analysen mit isolierter Gesamt-RNA aus Pflanzen durchgeführt, die zuvor für sieben Tage in nahezu N-freier Nährlösung gewachsen waren.
Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Induzierbarkeit mit Nitrat von *Tomate-lo1* in Wurzeln erhaltenen Ergebnisse stehen im wesentlichen im Einklang mit den für *Tomate-lo1* gezeigten Resultaten von Lauter et al. (1996). Allerdings war bei den eigenen Versuchen im Gegensatz zu Lauter et al. (1996) ein deutlicher Anstieg von *Tomate-lo1*-Transkripten in den Wurzeln der nitratinduzierten Pflanzen festzustellen. Lauter et al. (1996) beschreiben eine wurzelhaarspezifische Induktion von *Tomate-lo1*. Die etwa zehn Wochen alten Pflanzen waren zum Erhalt der Wurzelhaare in einem aeroponischen Kultursystem herangezogen worden. Bei der aus der Wurzelfraktion gewonnenen RNA konnten, im Gegensatz zur RNA aus Wurzelhaaren, keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Expression von *Tomate-lo1* in nitrathaltiger und N-freier Nährlösung festgestellt werden. Der Erhalt von Wurzelhaaren war mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tomatenwurzeln nur sehr bedingt möglich, da diese in einer Quarzsandkultur und damit weder hydroponisch noch aeroponisch gewachsen waren. Die erhebliche Zunahme von *Tomate-lo1*-Transkripten bei Nitratinduktion ist daher möglicherweise nicht auf eine wurzelhaarspezifische Induktion zurückzuführen. Dies könnte einerseits auf die deutlich längere Verweildauer der Pflanzen in nahezu N-freier Nährlösung (sieben Tage zu 36 h) und andererseits auf die erhöhte Nitratkonzentration in der zur Induktion eingesetzten Nährlösung (7,5 zu 5 mM NO_3^-) zurückgeführt werden. Die Zusammensetzung der Nährlösung, die zur Anzucht der Pflanzen vor der N-freien Phase eingesetzt wurde, spielt möglicherweise ebenfalls eine Rolle. So wurde von Lauter et al. (1996) eine Nährlösung verwendet, die relativ hohe Konzentrationen von NH_4^+ und NO_3^- (2 und 5 mM) enthielt. Die Stickstoffquelle der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nährlösung bestand nahezu ausschließlich aus Nitrat (Ammonium nur in Spuren vorhanden).
Die für *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* erhaltenen Resultate stehen im Einklang mit der beschriebenen Nitratinduzierbarkeit für die bislang bekannten Mitglieder der high-affinity Nitrattransporter-Familie höherer Pflanzen (Ono et al., 2000; Trueman et al., 1996; Amarasinghe et al., 1998; Krapp et al., 1998).
Die erhaltenen Signale entsprechen dabei den erwarteten Transkriptgrößen von 2 bis 2,1 kb für die low-affinity-Nitrattransportertranskripte und 1,8-1,9 kb für die high-affinity Nitrattransportertranskripte (Ono et al., 2000; Lauter et al., 1996).

4.3 Expression der Nitrattransportergene *Tomate-lo1* und *Tomate-hi3* sowie des Nitratreduktase- und eines Nitritreduktasegens von Tomate im Tagesgang

Ziel der durchgeführten Northern-Analysen zur Untersuchung der Expression von *Tomate-lo1* und *Tomate-hi3* im Tagesgang war nicht eine detaillierte Beschreibung des Expressionsverlaufes, sondern vielmehr eine grobe Abschätzung von möglicherweise auftretenden deutlichen Unterschieden zu den bereits bekannten diurnalen Veränderungen der Transkriptmengen von low- und high-affinity Nitrattransportergenen im Tagesverlauf (Ono et al., 2000; Lejay et al., 1999).
Von Tomate war bekannt, daß die Nitrataufnahme einer diurnalen Regulation unterliegt (Cardenas-Navarro et al., 1998; Le Bot und Kirkby, 1992). Die durchgeführte Untersuchung sollte die Auswahl eines geeigneten Erntezeitpunktes zur Untersuchung der Expression von Nitrattransportergenen in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten

Tomatenpflanzen erlauben. Daher wurden pro Erntezeitpunkt nur zwei Pflanzen für diesen Versuch eingesetzt.
Die für *Tomate-hi3* erhaltenen Ergebnisse ähneln den von Ono et al. (2000) für *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2* aufgeführten Daten mit zwei deutlichen Expressionsspitzen in der Mitte und gegen Ende der Lichtphase, obwohl die erheblich längere Lichtphase (18h) und die unterschiedliche Zusammensetzung der Nährlösung (2 mM KNO_3) einen direkten Vergleich erschweren.
Die von Lejay et al. (1999) für *Arabidopsis-hi1* dargestellten Expressionsdaten weisen vermutlich aufgrund der geringen Anzahl von Meßpunkten nur ein Expressionsmaximum gegen Ende der Lichtphase auf. Allerdings besitzt die mit $^{15}NO_3^-$ (1 mM) gemessene Nitrataufnahme von *Arabidopsis* neben dem Maximum gegen Ende bzw. kurz nach Ende der Lichtphase ein weiteres Maximum gegen Mitte der Lichtphase (Lejay et al., 1999).
Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Hybridisierungen mit einer Sonde für *Tomate-lo1* ergaben einen zu *Tomate-hi3* annähernd komplementären Verlauf in der Intensität der erhaltenen Signale. Dabei scheinen, im Gegensatz zu den für *Tomate-lo1* von Ono et al. (2000) dargestellten Daten, diese offenbar leicht phasenverschoben vorzuliegen. Dies könnte aber auch möglicherweise auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen oder auch auf wechselnde Lichtintensitäten im Gewächshaus zurückgeführt werden. Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierte ungewöhnlich starke Varianz der Signalintensitäten ist auf die geringe Anzahl eingesetzter Versuchspflanzen zurückzuführen.
Die Expression des Nitratreduktasegens ähnelt, wie auch von Ono et al. (2000) dargestellt, dem zeitlichen Verlauf der Expression von *Tomate-lo1*.
Scheible et al. (1997) erhielten in Abhängigkeit von der Nitratkonzentration der eingesetzten Düngelösung erhebliche Unterschiede im diurnalen Rhythmus der Expression von NR-Genen in Tabakblättern. Möglicherweise führen auch unterschiedliche Nitratkonzentrationen und damit unterschiedliche Bedarfssituationen der Pflanzen in Wurzeln zu Verschiebungen der diurnalen Veränderungen in der Expression von NR-, NiR und Nitrattransportergenen. Die Expression von Nitritreduktasegenen folgt hier offenbar jedoch nicht unmittelbar dem Expressionsverlauf des Nitratreduktasegens. Ein Maximum der Signalintensität wird wie bei *Tomate-hi3* erst gegen Ende der Lichtphase erreicht. Die vorliegenden Expressionsdaten zeigen, trotz der geringen Anzahl von Probenpunkten, daß *Tomate-hi3* einer vergleichbaren diurnalen Regulation wie die beiden anderen high-affinity Nitrattransportergene aus Tomate (*Tomate-hi1* und *Tomate-hi2*) unterworfen ist. Ausgehend von diesen Daten wurde der Erntezeitpunkt der Pflanzen festgelegt, da die untersuchten Gene zu diesem Zeitpunkt (17-18 Uhr) jeweils relativ hohe Transkriptmengen aufweisen.

4.4 Einfluß verschiedener Stickstoffquellen auf die Expression von Nitrattransportergenen, des Nitratreduktase- und eines Nitritreduktasegens in Tomatenwurzeln

Die Expression von Nitrattransportergenen wird durch die der Pflanze zur Verfügung stehenden Stickstoffquellen in erheblichem Maße beeinflußt. (Amarasinghe et al., 1998, Krapp et al., 1998 ; Zhuo et al., 1999 ; Vidmar et al., 2000b). Ebenso wird die Nitrataufnahme durch reduzierte Stickstoffverbindungen wie Ammonium und Glutamin gehemmt (Muller und Tourraine, 1992; Kronzucker et al., 1999). Das Expressionsverhalten mit unterschiedlichen äußeren Stickstoffquellen ist daher ein wichtiger Baustein zum Verständnis der Regulation von Nitrattransportergenen. Allerdings muß die Aktivität der Genprodukte keinesfalls mit der Transkriptmenge der entsprechenden Gene korreliert sein (Soualmi und Champigny, 1986). Ebenso bedeutet eine erhöhte Transkriptmenge nicht zwangsläufig eine Steigerung der Transkriptionsaktivität. So könnte z.B. eine veränderte

mRNA-Stabilität ebenfalls Einfluß auf zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandene Transkriptmengen haben.
Für *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit relativ hohe Transkriptmengen in mit Nitrat (7,5 mM) als Stickstoffquelle gewachsenen Pflanzen festgestellt werden. Deutlich weniger Transkripte traten in Pflanzen auf, die mit nahezu N-freier Nährlösung gewachsen waren. Hier konnten nun, im Gegensatz zu den Experimenten zur Nitratinduzierbarkeit in den Wurzeln, bei denen der Nachweis der Signale kolorimetrisch erfolgte, Transkripte von *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* auch bei Wachstum in nahezu N-freier Nährlösung nachgewiesen werden. Dies könnte auf die höhere Sensitivität des verwendeten Chemilumineszenz-Detektionssystems zurückgeführt werden. In den mit Ammonium als einziger Sticktoffquelle gewachsenen Pflanzen waren Transkripte der beiden high-affinity Nitrattransportergene *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* kaum nachweisbar. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen für high-affinity Nitrattransportergene bei *Arabidopsis* (Zhuo et al., 1999), Tabak (Krapp et al., 1998) und Soja (Amarasinghe et al., 1998). Dort konnte ebenfalls eine deutliche Repression von high-affinity Nitrattransportertranskripten mit Ammonium als Stickstoffquelle beobachtet werden. Durch Experimente mit verschiedenen Inhibitoren der N-Assimilation wurden von Zhuo et al. (1999) deutliche Hinweise erhalten, daß NH_4^+ selbst ein Regulator der Expression von *Arabidopsis-hi1* ist.
Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Transkripte von *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* werden verstärkt mit Nitrat als Stickstoffquelle gebildet - also auch in Kombination mit den reduzierten Stickstoffverbindungen Ammonium und Glutamin. Interessanterweise ist für *Tomate-hi3* auch eine starke Expression mit Glutamin als Stickstoffquelle zu beobachten. Die für *Tomate-hi3* erhaltenen Signale waren dabei im Vergleich zu *Tomate-hi2* in ihrer Intensität vierfach erhöht. Diese Resultate bezüglich Glutamin könnten auf eine unterschiedliche Regulation von *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* durch Glutamin hinweisen.
Als Ursache für die deutlich verschiedenen Signalstärken der Transkripte von *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* mit Glutamin als Stickstoffquelle wäre eine zeitlich differenzierte Expression der beiden Gene denkbar. Dies ist jedoch relativ unwahrscheinlich, da so deutliche Unterschiede in der Expression von *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* ausschließlich im Ansatz mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle auftreten.
Krapp et al. (1998) erhalten für *Tabak-hi1* bei *in vitro* gewachsenen Pflanzen ebenfalls sehr hohe Transkriptmengen mit 10 mM Nitrat (KNO_3) als einziger Stickstoffquelle und deutlich reduzierte Transkriptmengen mit Ammonium oder Glutamin als einzige Stickstoffquellen (jeweils 5 mM). Allerdings sind die bei Tabak auftretenden Transkriptmengen bei Wachstum mit Ammonium oder Glutamin nur geringfügig verschieden (30-50% der Transkriptmenge von nur mit Nitrat gewachsenen Pflanzen). Die Kombination von Ammonium und Glutamin mit gleichen Mengen Nitrat führt dort jedoch zu nochmals deutlich reduzierten Transkriptmengen, die etwa zwischen 10 und 20% der mit nur Nitrat erhaltenen Transkriptmengen liegen. Dies ist allerdings ein wesentlicher Unterschied zu den Resultaten mit *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3*, die in den Ansätzen mit Nitrat in Kombination mit Ammonium und Glutamin zu vergleichbar starken Hybridisierungssignalen führen wie in den Ansätzen mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle. Dies gilt insbesondere für die Kombination von Nitrat mit Glutamin. Dort liegen die Signalintensitäten für *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* sogar etwa 10% über den mit Nitrat als Stickstoffquelle erhaltenen Werten (Abb.27).
Krapp et al. (1998) machen keine Angaben über das Alter der *in vitro* gewachsenen Pflanzen oder über den Erntezeitpunkt im Tagesverlauf, so daß, trotz ähnlicher Konzentrationen der unterschiedlichen Stickstoffquellen, ein direkter Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen problematisch erscheint.

Wachstum mit Nitrat (10 mM KNO_3) als einziger Stickstoffquelle führt auch bei *Soja-hi1* zur größten Transkriptmenge, wohingegen nur mit Ammonium (10 mM NH_4Cl) Transkripte kaum nachweisbar sind (Amarasinghe et al., 1998). Die Kombination von Ammonium mit Nitrat ergibt Signalstärken von nur etwa 10% im Vergleich zu den mit Nitrat als Stickstoffquelle erhaltenen Signalen (Amarasinghe et al., 1998). Diese Experimente wurden mit mindestens zwei Wochen alten Soja-Pflanzen durchgeführt. Allerdings werden auch hier wiederum keine detaillierten Angaben zur Dauer des Experimentes, d.h. zur Dauer der Exposition mit den unterschiedlichen Stickstoffquellen und zum Erntezeitpunkt der Pflanzen gemacht. Vidmar et al. (2000b) beschreiben Transkriptmengenmessungen von high-affinity Nitrattransportergenen in Gerste nach Induktion mit Nitrat und Kombinationen mit verschiedenen Aminosäuren (Asn, Asp, Gln, Glu). Die dabei verwendete Gensonde soll in der Lage sein, alle Transkripte der Mitglieder der high-affinity Nitrattransporter-Familie zu erkennen. Es wurden sieben Tage alte Gerstenkeimlinge verwendet, die zuvor mit N-freier Nährlösung gewachsen waren. Die Induktion erfolgte dann über einen Zeitraum von 6h. Die stärksten Hybridisierungssignale bei Northern-Hybridisierungen wurden wiederum mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle erhalten. Alle eingesetzten AS (1 mM) in Kombination mit jeweils 10 mM Nitrat führten zu mindestens 60% Reduzierung der Transkriptmengen von high-affinity Nitrattransportergenen aus Gerste (Vidmar et al., 2000b).

Aufgrund von Untersuchungen mit unterschiedlichen Hemmstoffen der Nitratassimilation in Kombination mit verschiedenen Stickstoffquellen kommen Vidmar et al. (2000b) zur Aufstellung der Hypothese, daß Glutamin und nicht Ammonium der wesentliche negative Regulator der Transkriptmengen der Mitglieder der high-affinity Nitrattransporter-Familie in Gerste ist. Bei hohen äußeren Ammonium-Konzentrationen kam es auch zu einer drastischen Erhöhung der Glutamin-Konzentration in Gerstenwurzeln. Dieser Effekt könnte mit der Umwandlung von NH_4^+ zu Glutamin erklärt werden. Auch die Zugabe verschiedener Aminosäuren in die Nährlösung führte zu deutlich erhöhten Glutamin-Konzentrationen in den Wurzeln der untersuchten Pflanzen (Vidmar et al., 2000b).

In einer Studie von Wolt (1994) wurden 35 landwirtschaftlich genutzte Böden auf ihren Nitrat- und Ammoniumgehalt untersucht. Dabei waren durchschnittlich 6,0 mM NO_3^- und 0,77 mM NH_4^+ in der Bodenlösung vorhanden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Nährlösung kommt bezüglich ihres Nitratgehaltes den Bedingungen einer gut mit N versorgten landwirtschaftlichen Nutzfläche nahe. Nitrat kann nun aber, wie für Gerste gezeigt, bei Konzentrationen von 100µM in der Nährlösung als negativer Regulator des high-affinity Nitrataufnahmesystems fungieren (King et al., 1993). Bei der in der vorliegenden Arbeit gewählten Nitratkonzentration (7,5 mM) im Ansatz mit Nitrat als einziger N-Quelle kommt es offensichtlich auch nach 5 Tagen zu keiner wesentlichen Endprodukt-Regulation der Transkriptmenge von *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3*.

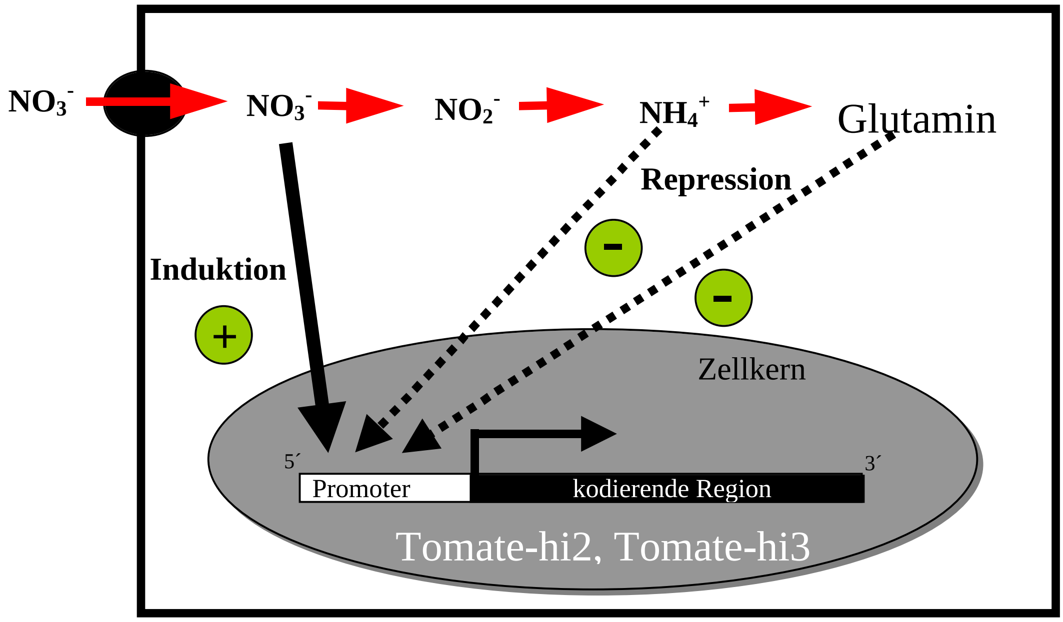
Daher erfolgt die von King et al. (1993) beschriebene Regulation des high-affinity Nitrataufnahme-Systems durch Nitrat offenbar nicht auf der Ebene der Transkription.

Für Nitrit wird derzeit ebenfalls eine Rolle bei der Regulation von high-affinity Nitrattransporter-Transkripten diskutiert. Nitrit, als toxisches Produkt der Nitratreduktase, ist in der Lage, die Nitrataufnahme zu induzieren (Siddiqi et al., 1992; King et al., 1993). Auch Vidmar et al. (2000a) konnten für high-affinity Nitrattransportergene in Gerste eine deutliche Zunahme der Transkriptmenge in Abhängigkeit von Nitritexposition feststellen.

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zum von Vidmar et al. (2000b) aufgestellten Modell der Transkript-Regulation von Komponenten des induzierbaren high-affinity Nitrataufnahme-Systems in Gerste. Für *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* wird daher in leichter Abwandlung ein Modell zur Expressionsregulation vorgeschlagen (Abbildung 48). Derzeit liegen allerdings keine Daten vor, die Hinweise auf

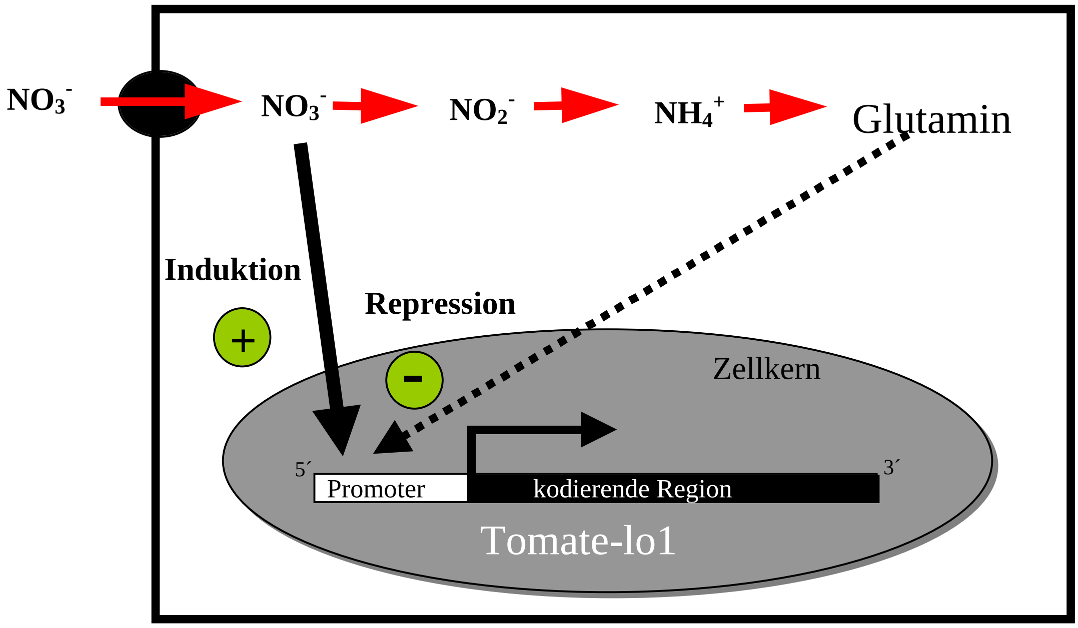
die bei der Regulation verwendeten Mechanismen (Transkriptionsfaktoren, Beteiligung einer Signaltransduktionskette, Vorhandensein eines Nitratsensors etc.) geben könnten.

Abbildung 48:



Legende zu Abbildung 48: Vorgeschlagenes Modell für die Transkript-Regulation der high-affinity Nitrattransportergene *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3*. Positive regulatorische Effekte (Induktion) sind als geschlossene Linie und negative Effekte (Repression) als gepunktete Linien dargestellt.

Abbildung 49:



Legende zu Abbildung 49: Vorgeschlagenes Modell für die Transkript-Regulation des low-affinity Nitrattransportergens ***Tomate-lo1***. Positive regulatorische Effekte (Induktion) sind als geschlossene Linie und negative Effekte (Repression) als gepunktete Linie dargestellt.

Zur Expression von low-affinity Nitrattransportergenen mit verschiedenen Stickstoffquellen über einen längeren Zeitraum liegen in der Literatur bisher nur wenige Daten vor. Von Lejay et al. (1999) wurden Northern-Analysen zur Expression von low-affinity Nitrattransportergenen in *Arabidopsis* mit NH_4NO_3 im Vergleich zu Nitrat als einziger Stickstoffquelle durchgeführt. Für die beiden bekannten low-affinity Nitrattransportergene aus Tomate (*Tomate-lo1* und *Tomate-lo2*) liegen bislang keine publizierten Untersuchungen zur Expression bei mehrtägiger Kultur mit unterschiedlichen Stickstoffquellen vor.

Bei *Tomate-lo1* handelt es sich offensichtlich um ein konstitutiv exprimiertes, jedoch durchaus nitratinduzierbares Gen (Lauter et al., 1996). Transkripte von *Tomate-lo1* sind daher auch in allen Ansätzen mit verschiedenen Stickstoffquellen eindeutig nachweisbar. Während jeweils im Ansatz mit N-freier Nährlösung und mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle nur sehr schwache Hybridisierungssignale auftreten, sind in allen anderen Ansätzen deutliche Signale zu erkennen. Bei Kombination von Glutamin und Nitrat ist eine etwa 50%ige Reduktion der Signalintensität im Vergleich zum Ansatz mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle zu erkennen.
Die deutlichen Hybridisierungssignale mit Ammonium als einziger Stickstoffquelle stehen im Einklang mit den von Lauter et al. (1996) für *Tomate-lo1* gezeigten Transkriptmengen nach 6h Induktion von sechs Wochen alten Tomatenpflanzen mit 2 mM NH_4^+.
Interessanterweise verhält sich *Tomate-lo1* bei den Untersuchungen zur Substratspezifität von Lauter et al. (1996) wie das Ammoniumtransportergen *LeAmt1* aus Tomate. Lauter et al. (1996) räumen jedoch ein, daß die für Ammonium dargestellten Transkriptmengen von *Tomate-lo1* nicht reproduzierbar auftraten.
Aus den im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Resultaten folgt, daß die Transkriptmenge von *Tomate-lo1* nicht wesentlich durch Ammonium beeinflußt wird. Dies gilt offenbar auch bei low-affinity Nitrattransportergenen von *Arabidopsis* (Lejay et al., 1999). Die in Abb.27 der vorliegenden Arbeit dargestellte deutliche Repression von *Tomate-lo1* in Anwesenheit von Glutamin (nur 20% der Signalintensität im Vergleich zum Ansatz mit Nitrat als Stickstoffquelle) entspricht nicht der von Lejay et al. (1999) für low-affinity Nitrattransportergene in *Arabidopsis* geäußerten Vermutung, daß diese keiner Endprodukt-Regulation durch N-Metabolite unterliegen. Dies trifft den eigenen Untersuchungen zufolge für *Tomate-lo1* nicht zu. Für *Tomate-lo1* wird ausgehend von den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Resultaten ein in Abbildung 49 dargestelltes Modell zur Transkriptionsregulation vorgeschlagen. Über die molekularen Mechanismen, die bei der Transkript-Regulation von low-affinity Nitrattransportergenen eine Rolle spielen, ist bisher nichts bekannt.

Die beiden der Nitrataufnahme folgenden enzymatischen Schritte der Nitratassimilation höherer Pflanzen werden durch die Nitrat- und Nitritreduktase katalysiert. Die Nitratreduktase ist das Schlüsselenzym der Nitratassimilation. Aus diesem Grunde könnte man erwarten, daß Nitratreduktasegen und Nitrattransportergene in einer vergleichbaren Weise reguliert werden. Faure et al. (1991) konnten zeigen, daß die Expression von Nitrat- und Nitritreduktasegenen koordiniert verläuft. Die Regulation erfolgt dabei durch N- und C-Metabolite (Vincentz et al., 1993).
Die Expression der Nitritreduktasegene ähnelt in den verschiedenen Ansätzen stark der Expression von *Tomate-hi2*. So sind in allen Ansätzen bei Anwesenheit von Nitrat deutliche Hybridisierungssignale zu erkennen. Das Expressionsmuster des Nitritreduktasegens ist durchaus mit den von Krapp et al. (1998) dargestellten Ergebnissen bei mit verschiedenen Stickstoffquellen gewachsenen Pflanzen vergleichbar. Die Nitratreduktase-Transkripte hingegen führen zu den stärksten Signalen im Ansatz mit Ammonium als

einziger Stickstoffquelle und sind daher nicht mit der Expression des Nitritreduktasegens und auch nicht mit den Resultaten der Nitratreduktaseaktivitäts-Messungen korreliert. Krapp et al. (1998) zeigen bei mit verschiedenen Stickstoffquellen gewachsenen Pflanzen eine koordinierte Expression von high-affinity Nitrattransporter-, Nitrat- und Nitritreduktasetranskripten.
Bei den Messungen der Nitratreduktase-Aktivitäten der Tomatenwurzeln war eine nahezu vollständige Hemmung der Nitratreduktaseaktivität bei Wachstum mit Ammonium als einziger Stickstoffquelle, wie von Crawford et al. (1988) für *Arabidopsis* beschrieben, mit reduzierten Formen des Stickstoffs nicht zu beobachten. Die für Ammonium erhaltene NR-Aktivität entspricht, in Relation zur NR-Aktivität von nur mit Nitrat gewachsenen Tomatenwurzeln, den von Quetz et al. (1982) beschriebenen Daten bei Wurzeln von Maiskeimlingen. Untersuchungen von MacKown et al. (1982) zeigen, daß exogenes NH_4^+ die Induktion der NR-Aktivität von Maiswurzeln mit 1 mM NO_3^- verhindert, es bei 5 mM bzw. 10 mM Nitrat jedoch zu einer Stimulation der Induktion der NR-Aktivität von Maiswurzeln bzw. Mungo-Bohnen kommt (Oaks et al. 1977; Oaks et al., 1979; Higgins et al., 1974).
Ammonium übt daher offensichtlich in Abhängigkeit von der äußeren Konzentration eine differenzierte Regulatorfunktion für die NR-Aktivität aus. Eine naheliegende Erklärung für die offenbar vorhandene Korrelation zwischen Expression von Nitritreduktase- und high-affinity-Nitrattransportergenen mit den gemessenen Nitratreduktaseaktivitäten, aber nicht mit den Signalstärken der Nitratreduktase-Transkripte, kann nicht gegeben werden. Hierbei könnten weitere Untersuchungen, unter Einbeziehung von photosynthetischen Parametern, der Messung von N-Metaboliten in Wurzeln und Sprossen der Pflanzen sowie Messungen der Glutaminsynthetase-Aktivität einen Beitrag zur Aufklärung der regulativen Zusammenhänge der an der Nitratassimilation beteiligten Gene unter den gegebenen Bedingungen leisten. Darüber hinaus könnte die Untersuchung von diurnalen Expressionsschwankungen von mit verschiedenen Stickstoffquellen gewachsenen Pflanzen weitere interessante Daten liefern, die zum Verständnis der bisher erhaltenen Resultate beitragen.
Die im Vergleich zu anderen Untersuchungen (z.B. Krapp et al., 1998) in der vorliegenden Arbeit auftretenden Unterschiede im Expressionsverhalten von low- und high-affinity Nitrattransportergenen und Nitratreduktasegenen bei Wachstum mit verschiedenen Stickstoffquellen lassen sich möglicherweise auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen (verschiedene Nährlösungen, unterschiedliche Nährsalzkonzentrationen, die Verwendung von unterschiedlichem Pflanzenmaterial (-spezies), verschiedene Erntezeitpunkte etc.) zurückführen.
Eine verschiedenartige Regulation einzelner Mitglieder der beiden Nitrattransportergen-Familien (z.B. *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* als Mitglieder der high-affinity Nitrattransportergen-Familie) ist grundsätzlich denkbar, zumal die Existenz von jeweils mehreren Mitgliedern der beiden Nitrattransporterfamilien innerhalb einer Spezies eine differentielle Regulation dieser Gene (z.B. in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Pflanzen) durchaus wahrscheinlich macht.

4.5 Lokalisierung der Transkripte von *Tomate-lo1* und *Tomate-hi3* in Tomatenwurzeln

Zwischen einzelnen Wurzelabschnitten können deutliche anatomische und physiologische Unterschiede bestehen. Somit könnte auch die Expression von Nitrattransportergenen im Verlauf einer Wurzellängsachse unterschiedlich ausgeprägt sein. Die zur Transkript-Lokalisierung durchgeführten *In situ*-Hybridisierungen erfolgten mit Tomatenwurzeln, die für fünf Tage in nahezu N-freier Nährlösung gewachsen waren und dann für 6h in Schalen

mit einer nitrathaltigen Nährlösung überführt worden waren. Bei den erhaltenen Resultaten der *In situ*-Hybridisierungen handelt es sich um die erste Darstellung einer Lokalisation der Transkripte eines high- und eines low-affinity Nitrattransportergens in den Wurzeln derselben Spezies unter identischen Nährstoffbedingungen. Damit wird ein direkter Vergleich der Expressionsmuster eines low- und eines high-affinity Nitrattransportergens möglich.
Die Resultate der zur Transkriptlokalisierung von *Tomate-lo1* durchgeführten *In situ*-Hybridisierungen ähneln den für *Arabidopsis-lo1* beschriebenen Expressionsmustern in Wurzeln von *Arabidopsis* (Huang et al. 1996). *Tomate-lo1* wird wie *Arabidopsis-lo1* in Zellen der Wurzelspitze und jungen differenzierten Rhizodermiszellen exprimiert. In älteren Wurzelteilen mit weiter entwickelter Stele und Xylem überwiegt die Akkumulation von *Tomate-lo1*-mRNA in Zellen des Cortex. Wie bei *Arabidopsis-lo1* kommt es hier ebenfalls in Längsrichtung der Wurzelachse zu einer Verlagerung der Expression ausgehend von Zellen der Rhizodermis in die Zellen des Cortex.
Die für *Tomate-hi3* erhaltenen Resultate entsprechen dem Expressionsmuster von *Tabak-hi1* bei den von Krapp et al. (1998) mit Tabakwurzeln durchgeführten *In situ*-Hybridisierungs-Experimenten. Eine deutliche Expression ist nahe der Wurzelspitze in Zellen der Rhizodermis aber auch in oder an Zellen des jungen Zentralzylinders zu beobachten. In älteren Teilen der Wurzel bleibt die Expression auf die epidermalen Zellen beschränkt.
Die starke Expression von Nitrattransportergenen in der noch nicht differenzierten Rhizodermis und in Zellen der Wurzelhaube (*Tomate-hi3*, Abb. 33C) bzw. in nicht ausdifferenzierten Zellen der Rhizodermis und des Rindenparenchyms (*Tomate-lo1*, Abb. 31A) könnte auf einen gesteigerten N-Bedarf der im Wachstum befindlichen Zellen der Wurzelspitzen zurückgeführt werden. In solchen stark wachsenden Bereichen von Wurzelspitzen konnten Siebrecht et al. (1995) hohe Nitratreduktaseaktivitäten nachweisen. Allerdings nimmt die Aufnahme von Nitrat, wie von Taylor und Bloom (1998) für Maiswurzeln gezeigt wurde, innerhalb des ersten Zentimeters von der Wurzelspitze an deutlich zu, um dann abgesehen von geringen Schwankungen über die nächsten 5 cm mehr oder minder konstant zu blei-ben.
Zur Überprüfung der auf Transkriptebene erhaltenen Lokalisierungen könnten Immunlokalisierungen der entsprechenden Komponenten der Nitrataufnahmesysteme höherer Pflanzen einen wichtigen Beitrag leisten.

4.6 *Tomate-lo1, Tomate-lo2, Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* werden auch in oberirdischen Pflanzenteilen exprimiert

Zur Untersuchung der Expression von low- und high-affinity Nitrattransportergenen in oberirdischen Pflanzenteilen von Tomate wurden Northern-Analysen, RT-PCR-Experimente und *In situ*-Hybridisierungen durchgeführt.
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Transkripte des low-affinity Nitrattransportergens *Tomate-lo1* im Gegensatz zu den Aussagen von Lauter et al. (1996) durch Northern-Analysen auch in Blatt-RNA nachgewiesen werden. Lauter et al. (1996) hatten Hybridisierungssignale von *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2* ausschließlich mit Wurzel-RNA erhalten. Tsay et al. (1993) konnten allerdings mit Northern-Analysen Transkripte des zu *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2* homologen low-affinity Nitrattransportergens *Arabidopsis-lo1* auch in Blatt-RNA von *Arabidopsis thaliana* nachweisen.
Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten RT-PCR-Experimente belegen, daß *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2* in oberirdischen Pflanzenteilen transkribiert werden und daß sie somit in ihrer Expression nicht auf die Wurzeln der Pflanzen beschränkt sind. Diese Befunde könnten auch auf eine Funktion für die beiden low-affinity-Nitrattransportergene

bei Nitrattransportprozessen außerhalb der Wurzel hindeuten, so z.B. bei der Xylementladung in Blättern. Das Nicht-Auftreten eines spezifischen PCR-Produktes für *Tomate-lo2* mit der cDNA aus vollständig entwickelten Blättern und nur im Agarosegel kaum erkennbaren PCR-Produkten mit cDNA aus jungen Früchten deutet auf geringere Transkriptmengen von *Tomate-lo2* in diesen Pflanzenteilen hin. Lauter et al. (1996) konnten eine zelltypspezifisch unterschiedliche Expression von *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2* in Tomatenwurzeln zeigen. Möglicherweise werden *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2* auch in oberirdischen Pflanzenteilen zelltypspezifisch exprimiert. Bei den durchgeführten *In situ*-Hybridisierungs-Experimenten konnten jedoch, vermutlich wegen der geringen Transkriptmengen in den verschiedenen oberirdischen Pflanzenteilen (Blätter, Stengel, Blüten, Früchte), keine spezifischen Signale erhalten werden. Diese hätten Aufschluß geben können über eine zelltypspezifische Funktion der Genprodukte von *Tomate-lo1* und *Tomate-lo2* in oberirdischen Pflanzenteilen von Tomate.

Transkripte von high-affinity Nitrattransportergenen höherer Pflanzen konnten bisher in nur zwei Fällen durch Northern-Analysen und in einem Fall durch *In situ*-Hybridisierung in oberirdischen Pflanzenteilen nachgewiesen werden. Zhuo et al. (1999) erwähnen, daß die mit Blatt-RNA aus *Arabidopsis* für *Arabidopsis-hi1* erhaltenen Hybridisierungssignale nur 1% der Signalintensität der mit Wurzel-RNA erhaltenen Signale ausmachen. Durch RT-PCR-Experimente konnten sie ferner zeigen, daß *Arabidopsis-hi1* und Ar*abidopsis-hi2* offenbar in Abhängigkeit vom Alter der verwendeten *Arabidopsis*-Keimlinge differentiell exprimiert werden. Von Krapp et al. (1998) wurden in Nitratreduktase-defizienten, high-affinity Nitrattransporter-Gene überexprimierenden Tabakmutanten Transkripte von *Tabak-hi1* in Blättern nachgewiesen. Ebenfalls in *Nicotiana plumbaginifolia* konnten Quesada et al. (1997) Transkripte von *Tabak-hi1* in Blättern, Knospen, Blüten und Samen nachweisen.

In keiner der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Northern-Hybridisierungen mit RNA aus Blättern und Stengeln von Tomate wurden Transkripte der beiden high-affinity Nitrattransportergene *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* nachgewiesen. Dies könnte möglicherweise auf eine nicht ausreichendende Sensitivität der verwendeten Chemilumineszenzdetektions-Methode zurückzuführen sein. Doch auch in „nested“-RT-PCR-Experimenten war nur mit cDNA aus jungen Früchten der Nachweis von *Tomate-hi3*-Transkripten möglich. Dieses Resultat konnte durch Hybridisierung von RACE-PCR-Produkten mit einer für *Tomate-hi3* spezifischen Sonde bestätigt und auf Blüten und junge Blätter ausgeweitet werden. Mit dieser Methode war auch der Nachweis von *Tomate-hi2*-Transkripten in Früchten und vollständig entwickelten Blättern möglich. Da es sich bei dieser RACE-Methode um eine Abfolge von PCR-Reaktionen handelt, sagt die Signalstärke, wie auch bei einer einfachen RT-PCR-Reaktion, kaum etwas über Transkriptmengen in den einzelnen Pflanzenteilen aus. Das Nicht-Auftreten von spezifischen PCR-Produkten oder Signalen bedeutet daher auch nicht automatisch, daß in den entsprechenden Pflanzenteilen keine Transkripte des betreffenden Gens vorliegen.

Die erhaltenen Resultate deuten im Vergleich zu high-affinity Nitrattransportergenen auf eine stärkere Expression von low-affinity Nitrattransportergenen in oberirdischen Pflanzenteilen von Tomate hin. Dies steht im Einklang mit der von Zhuo et al. (1999) geäußerten Vermutung, daß aufgrund der in der Regel recht hohen Nitratkonzentrationen im Xylemsaft (Glass und Siddiqi, 1995) von 5-20 mM, insgesamt eher die low-affinity Nitrattransporter eine relevante Funktion beim Transport von Nitrat in die Blätter besitzen könnten. Das reproduzierbare Nicht-Auftreten von spezifischen PCR-Produkten in den RT-PCR-Experimenten deutet auf eine möglicherweise organspezifische Expression der untersuchten Nitrattransportergene hin. Ein deutliches Muster, wie z.B. eine spezifische Expression bestimmter Nitrattransportergene ausschließlich in „Sink“- oder „Source“-Geweben, läßt sich dabei jedoch nicht feststellen.

Die zur Lokalisierung von *Tomate-hi3*-Transkripten in oberirdischen Pflanzenteilen durchgeführten *In situ*-RNA-Hybridisierungen erlaubten in keinem Falle den Nachweis von spezifischen Signalen beim Vergleich der Sense- und Antisense-Hybridisierungen. Diese Resultate lassen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die offenbar sehr niedrigen Tran-skriptmengen in den untersuchten Geweben erklären.
Zur Aufklärung der Funktion von Nitrattransportern in den oberirdischen Pflanzenteilen wären demnach wiederum Untersuchungen zur Immunlokalisation der betreffenden Proteine hilfreich.

4.7 Expression von Nitrattransportergenen in der arbuskulären Mykorrhiza

Voraussetzung für die Untersuchung der Expression von Tomatengenen in der arbuskulären Mykorrhiza ist die Verwendung von Pflanzenmaterial mit einer intensiven Kolonisierung der Wurzeln durch den pilzlichen Symbiosepartner.
In nicht-Nährstoff-limitierten Böden, z.B. bei intensiver Düngung im Ackerbau, sind Pflanzen in der Regel nur geringfügig mykorrhiziert (Daft und Nicolson, 1969; Peat und Fitter, 1993). Um nun eine optimale Mykorrhizierung der Pflanzen zu erreichen, wurden die in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen unter Phosphat-limitierenden Bedingungen herangezogen (Koide und Li, 1990). Die zur Düngung der Pflanzen verwendete Hoagland-Nährlösung enthält vorwiegend Nitrat als Stickstoffquelle, wohingegen Ammonium nur in Spuren vorhanden ist. Die unter diesen Bedingungen erzielten Mykorrhizierungsgrade lagen durchschnittlich bei etwa 80% (siehe Kap. 2.1.6). Durch die nicht-limitierte Versorgung des Systems mit Nitrat erscheint die N-Versorgung von Pilz und Pflanze über den Weg der Nitratassimilation als sehr wahrscheinlich. Wenn in der Symbiose die Versorgung der Wirtspflanze mit Nitrat durch den AM-Pilz verbessert würde, so sollte man unter Umständen eine verstärkte Expression von an der Nitratassimilation beteiligten Genen und eine Aktivitätssteigerung der entsprechenden Enzyme beobachten können. Erfolgt hingegen die verbesserte N-Versorgung durch den pilzlichen Symbiosepartner in Form von reduzierten Stickstoffformen (z.B. NH_4^+, Aminosäuren), so wäre eine Reduktion der Genexpression und Aktivität der an der Nitratassimilation beteiligten Gene bzw. Enzyme der Wirtspflanze denkbar.
Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine allgemeine Reduktion von Nitrattransportertranskripten in mykorrhizierten Tomatenwurzeln beobachtet werden. Vielmehr lassen sich für *Tomate-lo1* und *Tomate-hi2* keine deutlichen Unterschiede der in den Northern-Analysen erhaltenen Signalstärken zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln feststellen. Bei den durchgeführten *In situ*-Hybridisierungen konnten sowohl in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenwurzeln keine spezifischen Signale für *Tomate-lo1* erhalten werden. Dies kann durch die im Vergleich zu *Tomate-hi3* erheblich schwächeren Hybridisierungssignale von *Tomate-lo1*, die zum Nachweis wesentlich längere Auflagezeiten benötigten (3h zu 24h), erklärt werden. Im Gegensatz zu *Tomate-hi2* und *Tomate-lo1* ist die Expression von *Tomate-hi3* in mykorrhizierten Wurzeln deutlich erhöht. Die mit RNA aus mykorrhizierten Wurzeln auftretenden Signale sind dabei etwa doppelt so stark wie die mit RNA aus nicht-mykorrhizierten Pflanzen erhaltenen Signale. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Unterschied in der Signalstärke einer zweifach erhöhten Transkriptmenge entspricht. Dabei war unter den gewählten Bedingungen ein offenbar nahezu linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Signalstärke zu beobachten.

Die zur Transkriptlokalisierung durchgeführten *In situ*-RNA-Hybridisierungen ergaben, daß die Expression von *Tomate-hi3* in mykorrhizierten Wurzeln nicht auf die Rhizodermis

beschränkt bleibt, sondern auf Zellen des Rindenparenchyms ausgedehnt wird. Eine Akkumulation von Transkripten an den Arbuskel-enthaltenden Zellen, wie dies von Rosewarne et al. (1999) für die Transkripte eines Phosphattransportergens (LePT1) aus Tomate gezeigt wurde, konnte für Transkripte von *Tomate-hi3* nicht beobachtet werden. Arbuskeln werden als bevorzugter Ort des Nährstoffaustausches zwischen Pilz und Pflanze angesehen (Bonfante-Fasolo, 1984; Smith und Smith, 1990). Rosewarne et al. (1999) beschreiben darüber hinaus eine in nicht-mykorrhizierten Pflanzen im Vergleich zu mykorrhizierten Pflanzen deutlich erhöhte Transkriptmenge von LePT1, während Liu et al. (1998a) eine Reduktion der Transkriptmengen zweier Phosphattransportergene (MtPT1 und MtPT2) aus *Medicago truncatula* in mit *Glomus versiforme* mykorrhizierten Wurzeln zeigen konnten. Beide Gene von *Medicago* werden unter Phosphatmangelbedingungen induziert. Für das vorwiegend in Zellen der Rhizodermis und des Zentralzylinders exprimierte LePT1 konnte ebenfalls eine Zunahme der Transkriptmenge bei Phosphatmangel gezeigt werden (Daram et al.,1998; Liu et al., 1998b). Die Induzierbarkeit durch ihre Substrate unterscheidet die pflanzlichen Nitrattransportergene von bekannten Phosphat- und Sulfattransportergenen höherer Pflanzen (Smith et al., 1997; Daram et al., 1998).
Eine ähnliche Erweiterung der räumlichen Expression wie bei *Tomate-hi3* sowie eine Erhöhung der Transkriptmenge in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung mit *Glomus versiforme* wurde von Harrison (1996) für einen Hexosetransporter (Mtst1) von *Medicago truncatula* beschrieben. Hier war die Expression in Wurzelbereichen mit intensiver Kolonisierung mit *Glomus versiforme* ebenfalls auf Zellen des Cortex ausgeweitet. Allerdings wiesen auch hier die Arbuskel-enthaltenden Zellen keine intensivere Expression auf. Die räumliche Erweiterung der Expression von *Tomate-hi3* könnte auch für die höheren Transkriptmengen von *Tomate-hi3* in mykorrhizierten Pflanzen verantwortlich sein.
Tomate-hi3 wird somit in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung, möglicherweise durch eine veränderte Nährstoffsituation in den Zellen des Cortex, unter den gewählten Bedingungen in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen räumlich und quantitativ differentiell exprimiert. Dies könnte damit erklärt werden, daß eine in den Wirtswurzeln als Folge der Mykorrhizierung auftretende lokale Erhöhung der Nitratkonzentration zur verstärkten Expression des mutmaßlichen high-affinity Nitrattransportergens führt. In diesem Erklärungsmodell müßten sich weitere Nitrattransportergene bezüglich ihrer Regulation oder kinetischen Eigenschaften von *Tomate-hi3* unterscheiden. Dies ist, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, für die Repression durch Glutamin bei *Tomate-hi2* der Fall. Ist *Tomate-hi3* durch Glutamin weniger stark reguliert als *Tomate-hi2*, so könnte *Tomate-hi3* bei einer Versorgung mit reduzierten N-Formen (z.B. Aminosäuren) durch den pilzlichen Symbionten nicht wie die anderen Transporter reprimiert, sondern heraufreguliert werden und so eine parallele Nitrat-Versorgung (unter Umständen ebenfalls durch den pilzlichen Symbiosepartner) ermöglichen. Für diese Annahmen gibt es derzeit jedoch keine experimentellen Nachweise, zumal das Substratspektrum und die kinetischen Eigenschaften von *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* noch nicht untersucht worden sind. Da *Tomate-hi3* nicht spezifisch verstärkt in den Arbuskel-enthaltenden Zellen des Cortex exprimiert wird, ist eine unmittelbare Beteiligung an den zwischen Pilz und Pflanze an den Arbuskeln stattfindenden Transportprozessen eher unwahrscheinlich. Dennoch deuten die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten auf eine spezifische Beteiligung von *Tomate-hi3* an Prozessen der Nitratassimilation in der arbuskulären Mykorrhiza hin.

4.8 Expression von Nitrat-und Nitritreduktasegenen in der arbuskulären Mykorrhiza

Wie von Kaldorf et al. (1998) für mykorrhizierte Maiswurzeln gezeigt werden konnte, wird auch in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten mykorrhizierten Tomatenwurzeln das Nitratreduktasegen des pilzlichen Symbionten (*Glomus intraradices*) transkribiert. Die deutlich schwächeren, mit RNA aus Kontrollpflanzen erhaltenen Signale sind dabei auf eine Kreuzhybridisierung mit Transkripten der Nitratreduktase (Kaldorf et al., 1998) von Tomate zurückzuführen.
Das extraradikale Myzel (ERM) von AM-Pilzen, das für Aufnahme und Transport von Nährstoffen zur Wirtspflanze verantwortlich ist, kann bis zu 92% der Wurzelmasse der Wirtspflanze betragen (Fujiyoshi et al., 2000). Das ERM könnte somit einen wesentlichen Beitrag zur Nährstoffversorgung des pflanzlichen Partners leisten. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals mittels RT-PCR gezeigt werden, daß Nitratreduktasegene in aus dem Kompartimentsystem isoliertem extraradikalen Myzel (ERM) von *Glomus intraradices* transkribiert werden. Die beiden klonierten PCR-Produkte deuten dabei möglicherweise auf mehrere Nitratreduktasegene im Genom von *Glomus intraradices* hin. Die Ascomyceten *Neurospora crassa* und *Aspergillus nidulans* besitzen jedoch nur je ein Nitratreduktasegen (Marzluf, 1997). Die durchgeführten RT-PCR-Experimente bestätigen aber die erstmals mit Rohextrakten des ERM gemessenen Nitratreduktaseaktivitäten.
Bei den zur Herstellung der Rohextrakte verwendeten Teilen des ERM handelte es sich um nicht-steriles Material. Die gewählte Kulturmethode zur Separation der extraradikalen Hyphen ist nicht axenisch, so daß grundsätzlich mit der Anwesenheit von chemolithotrophen und mit AM-Pilzen assoziierten Bakterien zu rechnen ist. Daher ist möglicherweise ein Teil der gemessenen NRA auf zusätzliche mikrobielle Aktivität zurückzuführen. Allerdings sind in dem zur Kultur benutzten gewaschenen autoklavierten Quarzsand kaum organische Materialien vorhanden, die ein größeres Vorkommen saprophytischer Organismen erlauben würden. Darüber hinaus konnten unter dem Mikroskop neben Hyphen und Sporen von *Glomus intraradices* keine anderen Pilze beobachtet werden.
Das von Kaldorf et al. (1994, 1998) publizierte Gensegment einer Nitratreduktase aus *Glomus intraradices* Sy167 konnte auch mit aus ERM des gleichen AM-Isolats isolierter DNA in PCR-Experimenten nicht amplifiziert werden. Aufgrund der von einigen Arbeitsgruppen gezeigten Heterogenität der rDNA von arbuskulären Mykorrhizapilzen (Zézé et al., 1997; Lloyd-MacGilp et al., 1996; Pringle et al., 2000) könnte man vermuten, daß auch auf Ebene der „Haushaltsgene" mehrere unterschiedliche Gene in genetisch unterschiedlichen Kernen vorliegen und möglicherweise differentiell exprimiert werden. Eine variable genetische Ausstattung bei AM-Pilzen könnte erklären, weshalb das von Kaldorf et al. (1994) aus *Glomus intraradices* Sy167 erhaltene Gensegment der pilzlichen Nitratreduktase nicht amplifiziert werden konnte. Dieser Problematik bei der Untersuchung und Charakterisierung von AM-Pilzen sollte in Zukunft eine verstärkte Aufmerksamkeit entgegengebracht werden.
Die gemessenen NR-Aktivitäten des ERM bestätigen die Fähigkeit von AM-Pilzen, Nitrat reduzieren zu können (Ho und Trappe, 1975, Kaldorf et al., 1994, Johansen et al., 1996). Allerdings sind zwischen den gemessenen NADH- und NADPH-abhängigen NR-Aktivitäten des ERM keine deutlichen Unterschiede zu erkennen. Kaldorf et al. (1998) hatten aufgrund einer Erhöhung der NADPH-abhängigen NRA in mykorrhizierten Maiswurzeln die Vermutung geäußert, daß diese Erhöhung auf die Aktivität des pilzlichen Enzyms zurückgeführt werden könne, zumal die Nitratreduktasen von Ascomyceten (*Neurospora* sp.) NADPH als Elektronendonor bevorzugen (Crawford und Arst, 1993). Eine verstärkt NADPH-abhängige NRA konnte mit Rohextrakten des ERM nicht beobachtet werden. Die bisherigen Befunde zeigen, daß extraradikale Bestandteile des Myzels arbuskulärer Mykorrhizapilze in der Lage sind, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. In intra-

radikalen Bereichen des Myzels konnten pilzliche Nitratreduktasetranskripte nachgewiesen werden. Möglicherweise sind an der Nitratreduktion, darauf deuten die RT-PCR-Experimente hin, unterschiedliche Nitratreduktasen in verschiedenen Bereichen des pilzlichen Myzels beteiligt. Weitere Untersuchungen könnten die dargestellten Resultate erweitern, wobei insbesondere der *In situ*-Nachweis von *Glomus*-Nitratredukase-transkripten und die Immunlokalisation der pilzlichen NR im ERM und in der Wirtswurzel einen Beitrag zur Aufklärung von Funktion und Aktivität der NR von *Glomus intraradices* leisten könnten.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch den Einsatz von Gensonden für Nitrat- und Nitritreduktasen von Tomate gezeigt werden, daß sich die Expression der entsprechenden Gene in den Wurzeln der mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen nur wenig (innerhalb der Fehlergrenzen) voneinander unterscheidet. In den Blättern der mykorrhizierten Pflanzen sind leicht erhöhte Transkriptmengen von Nitrat- und Nitritreduktasegenen zu beobachten.

Die Expression eines Gens ist nicht unbedingt mit Vorhandensein und Aktivität des Genproduktes korreliert. So konnten z.B. in Weizen mit immunologischen Verfahren wesentlich höhere NR-Konzentrationen in den Wurzeln als in den Blättern festgestellt werden, obwohl die NR-Aktivität in den Blättern deutlich höher war (Soualmi und Champigny, 1986). Diese Befunde könnten mit einer höheren Umsatzrate bei der Bildung und Inaktivierung der Nitratreduktase in Wurzeln erklärt werden. Dies gilt möglicherweise auch für die pilzliche NR, deren Transkripte in den mykorrhizierten Wurzeln nachweisbar sind, dort jedoch zu keiner erheblich erhöhten NRA im Vergleich zu Kontrollpflanzen führt.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluß der Mykorrhizierung auf die NRA in Tomatenpflanzen ergeben ein ähnliches Bild wie die Nitratreduktase-Transkriptanalysen. So unterscheiden sich die gemessenen NR-Aktivitäten von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln im Rahmen der Fehlergrenzen nur wenig voneinander. Die NRA aus nicht-mykorrhizierten Wurzeln ist jedoch um bis zu 35% niedriger als in mykorrhizierten Wurzeln. Für die leicht erhöhte NRA in den Wurzeln der mykorrhizierten Pflanzen könnte durchaus die möglicherweise in den mykorrhizierten Wurzeln exprimierte Nitratreduktase von *Glomus intraradices* verantwortlich sein. Der Anteil der pilzlichen NRA an der Gesamt-NRA läßt sich jedoch nicht bestimmen, da die pilzliche NR offenbar nicht nur überwiegend eine NADPH-spezifische Aktivität aufweist. Die NRA in Blättern von mykorrhizierten Pflanzen liegt signifikant um etwa 15-20% höher als in nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen. Obwohl es in Tomate nur ein NADH-spezifisches Enzym geben soll (Daniel- Vedele et al., 1989), liegt auch in nicht-mykorrhizierten Pflanzen interessanterweise die gemessene NADPH-abhängige NRA stets nur wenig unterhalb der NADH-abhängigen NRA.

Die im Vergleich von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen erhaltenen Resultate zur Aktivität der Nitratreduktase sind durchaus mit den Ergebnissen einiger anderer Studien vergleichbar. Von Hawkins und George (1999) konnten unter Phosphat-limitierenden Bedingungen in mit *Glomus mosseae* mykorrhizierten Weizenpflanzen (> 90% Kolonisierung) ebenfalls erhöhte *In vitro*-NRA-Meßwerte erhalten werden. Dabei waren allerdings, im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen bei Tomate, die größten Unterschiede in den Wurzeln der mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen zu beobachten. Messungen der *In vivo*-NRA führten zu erheblich deutlicheren, statistisch signifikanten Unterschieden in Wurzeln und Blättern von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen. In der Untersuchung von Cliquet und Stewart (1993), die unter optimalen, nicht-limitierenden Nährstoffbedingungen mit Maispflanzen durchgeführt wurde, war die *In vivo*-NRA in Sprossen und Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen etwa doppelt so hoch wie in den nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen. Aus den Messungen des Chitingehaltes der mykorrhizierten Wurzeln wird allerdings deutlich, daß die von Cliquet

und Stewart (1993) untersuchten Maispflanzen Mykorrhizierungsgrade deutlich unter 50% aufwiesen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tomatenpflanzen zeigten hingegen eine Mykorrhizierung von etwa 80% (Kap. 3.6). Inwieweit die relativ geringe Mykorrhizierung bei Cliquet und Stewart (1993) die deutlich erhöhten Nitratreduktaseaktivitäten beeinflußt hat, bleibt unklar.
Mathur und Vyas (1995) konnten für mit *Glomus mosseae* mykorrhizierte *Ziziphus mauritiana* ähnliche *In vivo*-NRA-Werte wie Cliquet und Stewart (1993) erhalten. Eine weitere Studie zum Einfluß der Mykorrhizierung auf die Aktivität der an der Nitratassimilation beteiligten Enzyme von *Zea mays* wurde von Subramanian und Charest (1998) publiziert. Die dort mit einfacher Hoagland-Nährlösung gedüngten Pflanzen waren zu 75% mit *Glomus intraradices* kolonisiert. Die gemessenen NRA-Werte (NADH-abhängig) für mykorrhizierte und nicht-mykorrhizerte Pflanzen ähneln durchaus den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten für Tomate in Symbiose mit *Glomus intraradices*. So liegen die Werte der mykorrhizierten Pflanzen eines gegenüber Trockenstreß sensitiven Kultivars in den Blättern um etwa 20%, in den Wurzeln hingegen sogar 40% oberhalb der mit Extrakten der Kontrollpflanzen erhaltenen NRA-Meßwerte. Diese Effekte traten unter Trockenstreßbedingungen deutlich verstärkt auf. Für die in mykorrhizierten Wurzeln von Mais und Weizen (Subramanian und Charest, 1998; Hawkins und George, 1999) beobachtete verstärkte Erhöhung der NRA könnte die Nitratreduktase des pilzlichen Symbionten verantwortlich gemacht werden. Andererseits könnte es sich auch um einen für Poaceen spezifischen Effekt handeln.
Vergleichbare Resultate, in Abhängigkeit von Trockenstreß, wurden von Ruiz-Lozano und Azcón (1996) publiziert. Dort wurden bei mit *Glomus deserticola* mykorrhizierten Salatpflanzen, die Trockenstreß ausgesetzt waren, deutlich erhöhte NRA-Meßwerte erhalten. Die bei Trockenheit zunehmende Immobilisierung von Nitrat und eine daraus resultierende effektivere Versorgung mit Nitrat durch den pilzlichen Symbiosepartner könnten diese Effekte erklären. Allerdings kommt es offensichtlich auch ohne Trockenstreß zu erhöhten Nitratreduktaseaktivitäten in mykorrhizierten Pflanzen. In einer Untersuchung von Oliver et al. (1983) mit *Trifolium subterraneum* besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen NRA und der pro Zeiteinheit mit dem Gießwasser vor der Ernte der Pflanzen verabreichten Menge Nitrat. Bei relativ großen Nitratmengen (450 µmol/Topf und Tag) traten in Sprossen und Wurzeln der mykorrhizierten Pflanzen höhere NR-Aktivitäten als in den Kontrollpflanzen auf. Ein völlig anderes Bild ergab sich bei einer geringeren Menge Nitrat (112,5 µmol/Topf und Tag). Hier waren die NR-Aktivitäten in den Kontrollpflanzen, insbesondere in den Wurzeln, bis zu fünfmal höher als in den mykorrhizierten Pflanzen.
Eine mögliche Abhängigkeit von den äußeren N-Bedingungen könnte eine Erklärung für die in der Literatur auftretenden Diskrepanzen hinsichtlich der NRA in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen sein. Die von Kaldorf et al. (1998) beschriebene deutliche Reduktion von Nitratreduktaseaktivitäten in mykorrhizierten Maispflanzen könnte möglicherweise so erklärt werden. Die in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Nitratreduktase-Aktivität eingesetzten Tomatenpflanzen wurden, im Vergleich zu den von Kaldorf et al. (1998) untersuchten Maispflanzen, etwa mit der doppelten Menge Nitrat pro Zeiteinheit gedüngt. Dies könnte einen entsprechenden Einfluß auf die gemessenen Nitratreduktase-Aktivitäten gehabt haben.
Von Oliver et al. (1983) wurde eine mögliche Korrelation von Phosphatversorgung und NRA aufgezeigt. Dies konnte von Hawkins und George (1999) nicht bestätigt werden.
Eine weitere Ursache der uneinheitlichen Resultate verschiedener Arbeitsgruppen könnte in der verwendeten AM-Pilz-Spezies bzw. der Kombination von Pilz und Pflanze begründet liegen. Die Untersuchungen von Mathur und Vyas (1995) zum Einfluß verschiedener AM-Isolate auf die NRA von *Ziziphus mauritiana* zeigen, daß in Abhängigkeit vom jeweiligen AM-Pilz die NRA im Sproß der Pflanzen, im Vergleich zu den nicht-mykorrhizierten

Kontrollpflanzen, entweder erhöht oder erniedrigt sein kann. Ebenso kann der Gesamtstickstoffgehalt von Pflanzen in Abhängigkeit vom AM-Isolat deutlich variieren (Azcón et al., 1992). Ein anderer wichtiger Anhaltspunkt könnte das Alter der Versuchspflanzen sein. Bei Oliver et al. (1983) unterscheiden sich die NR-Aktivitäten von *Trifolium subterraneum* im zeitlichen Verlauf des Experimentes, d.h. mit der weiteren Entwicklung der Pflanzen erheblich voneinander (Tag 19-52). Möglicherweise sind entwicklungsspezifische Veränderungen der NRA für jede Pflanze-/Pilz-Kombination in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen in verschiedenartiger Weise ausgeprägt.
Darüber hinaus werden bei den meisten Untersuchungen trotz der bekannten diurnalen Veränderungen der NRA keine Angaben zum Erntezeitpunkt der Pflanzen gemacht. Auch dies könnte die Interpretation der angegebenen Daten erleichtern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten mit der in mykorrhizierten Pflanzen deutlich erhöhten Transkriptmenge und veränderten räumlichen Expression des high-affinity Nitrattransportergens *Tomate-hi3*, den leicht erhöhten NR-Aktivitäten und Transkriptmengen des Nitratreduktase- und Nitritreduktase-Gens (vor allem in den Blättern) auf eine durchaus verbesserte Versorgung der mykorrhizierten Pflanzen mit Nitrat durch den pilzlichen Symbionten hin. Allerdings zeigt die relativ hohe NR-Aktivität des ERM von *Glomus intraradices*, daß vom Pilz aufgenommenes Nitrat auch außerhalb der Wirtswurzel reduziert wird. Unter welchen physiologischen Bedingungen Stickstoff an die Wirtspflanze abgegeben wird und in welcher Form dies überwiegend geschieht, bleibt unklar. Der Nachweis pilzlicher Nitratreduktase-Transkripte in den intraradikalen Strukturen des Mikrosymbionten deutet möglicherweise auf die Abgabe von stärker reduzierten Stickstoffformen an die Wirtspflanze hin, könnte aber auch der Eigenversorgung des AM-Pilzes dienen.
Versuchsergebnisse, die unmittelbar gegen eine Beteiligung von AM-Pilzen an der Nitratassimilation in der Symbiose sprechen, wurden in der vorliegenden Arbeit nicht erhalten.

4.9 Abschätzung des pilzlichen rRNA-Anteils an der Gesamt-RNA mykorrhizierter Tomatenwurzeln

Innerhalb einer AM-Wirtswurzel befinden sich Pilzstrukturen und pflanzliches Gewebe in einer kaum auflösbaren räumlichen Nähe. Der pilzliche Partner besitzt in der arbuskulären Mykorrhiza innerhalb der Wurzeln, in Abhängigkeit von der kolonisierten Wurzellänge, einen durch Messung des Chitin-Gehaltes ermittelten Biomasseanteil von 4-20% (Hepper, 1977). Dies läßt jedoch nicht automatisch auf den pilzlichen Anteil der aus mykorrhizierten Wurzeln isolierten Gesamt-RNA schließen. Von AM-Pilzen sind bisher keine Gene bekannt, die als konstitutiv exprimiert gelten und eine Normalisierung von Transkriptmengen gewährleisten können oder sowohl präsymbiotisch als auch in der symbiotischen Phase konstitutiv transkribiert werden. Die bei Pflanzen häufig zur Transkriptmengen-Normalisierung eingesetzten Gene für Actin und Tubulin werden in der arbuskulären Mykorrhiza und anderen Pilz-/Pflanze-Interaktionen differentiell exprimiert und sind daher wenig geeignet (Bonfante et al., 1996; Genre und Bonfante, 1998; Jin et al., 1999).
Unter der Voraussetzung, daß die AM-Pilz-mRNA nur wenige Prozent der pilzlichen Gesamt-RNA ausmacht, würde die genaue Kenntnis des pilzlichen rRNA-Anteils die Normalisierung von Transkriptmengen in der arbuskulären Mykorrhiza erleichtern. In vielen Untersuchungen zur Genexpression in der AM wurde eine Normalisierung von Transkriptmengen wegen des offenbar geringen pilzlichen Biomasseanteils mykorrhizierter Wurzeln als nicht notwendig erachtet. Wird ein pflanzliches Gen in seiner Expression stark heraufreguliert, stellt dies qualitativ gesehen kein Problem dar. Kommt es aber bei der Signal-

stärke zu einer leichten Absenkung, könnte dafür der pilzliche RNA-Anteil an der Gesamt-RNA mykorrhizierter Wurzeln verantwortlich sein und nicht etwa eine veränderte Genexpression.
In der Ektomykorrhiza-Symbiose zwischen *Eucalyptus globulus* und *Pisolithus tinctorius* konnten Carnero Diaz et al. (1997) durch vergleichende Hybridisierungen mit pflanzlichen und pilzlichen rRNA-Sonden zeigen, daß bis zu 80% der rRNA-Transkripte pilzlichen Ursprunges sein können. Mit Hilfe solcher ITS-Sonden wurden bislang Transkriptmengen pilzlicher Hydrophobine und pflanzlicher-α-Tubuline in der Ektomykorrhiza-Entwicklung normalisiert (Carnero Diaz et al., 1996; Tagu und Martin, 1996).
In ähnlicher Weise sollte auch die Bestimmung des pilzlichen rRNA-Anteils von mit AM-Pilzen mykorrhizierten Wurzeln eine Normalisierung spezifischer Transkripte in der Symbiose erlauben. Dies würde gesichertere Aussagen über Verringerung oder Zunahme der Transkriptmenge eines Gens in der arbuskulären Mykorrhiza erlauben. Dies gilt natürlich nur unter der Voraussetzung einer konstitutiven Expression der rRNA-Gene von *Glomus intraradices* in verschiedenen Stadien der Symbiose, wie auch in extraradikalen Hyphen und in den Strukturen innerhalb der Wirtswurzel.
Mit der rRNA-Sonde aus der ITS-Region der rDNA von *Glomus intraradices* ist eine Differenzierung zwischen pilzlicher und pflanzlicher RNA aufgrund der gezeigten unterschiedlichen Hybridisierungseigenschaften möglich. Allerdings ist die Verwendung der ITS1-Sonde von *Glomus intraradices* als absolut spezifische Sonde ohne auftretende Kreuzhybridisierung, wie im Falle der Ektomykorrhizasymbiose für 5,8S-rRNA-Sonden von *Eucalyptus globulus* und *Pisolithus tinctorius* von Carnero Diaz (1997) gezeigt werden konnte, wegen der dargestellten Kreuzhybridisierung mit der rRNA von Tomate offenbar nicht möglich (Kap. 3.10, Abb.42).
Die durchgeführten RNA-Dot-Blot Experimente erlaubten eine Abschätzung des pilzlichen rRNA-Anteils in mykorrhizierten Wurzeln, der mit etwa 40-50% der Gesamt-RNA, im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Biomasseanteilen, relativ hoch ist. Diese Abschätzung ist erst durch die Verfügbarkeit von relativ großen Mengen extraradikalen Myzels aus dem Kompartiment-System möglich geworden. Nur so konnte die Isolierung von ausreichenden Mengen pilzlicher RNA (einige µg) gewährleistet werden. Die Modifizierung der verwendeten Sonde, d.h. eine Erhöhung der Spezifität durch Beschränkung auf eine der ITS-Regionen, ohne den stärker konservierten 5,8S-rDNA-Bereich, könnte die Ergebnisse dieser Untersuchungen möglicherweise weiter verbessern. Harrison und van Buuren (1995) nutzten ein offenbar semiquantitatives RT-PCR-Verfahren mit pilzspezifischen rDNA-Primern, um die Menge pilzlicher rRNA in mykorrhizierten Wurzeln und extraradikalen Hyphen miteinander zu vergleichen. Mit RNA aus extraradikalen Hyphen konnte ein nur 1,83-fach stärkeres Signal als mit RNA aus mykorrhizierten Wurzeln erhalten werden. Dies ist ein weiterer Hinweis auf relativ hohe pilzliche RNA-Anteile in mykorrhizierten Wurzeln. Allerdings wurden von Krajinski et al. (2000) bei Northern-Hybridisierungen mit einer Sonde bestehend aus den ITS-Regionen, inklusive 5,8S-rDNA von *Medicago truncatula*, keine wesentlichen Unterschiede in der Signalintensität zwischen RNA aus mit *Glomus mosseae* mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln festgestellt. Die eingesetzte Sonde soll dabei zu keiner Kreuzhybridisierung mit der 5,8S-rRNA des pilzlichen Symbionten (*Glomus mosseae*) führen. Aus diesen Resultaten wurde geschlossen, daß der pilzliche RNA-Anteil an der Gesamt-RNA der untersuchten 19 Tage alten Pflanzen mit einer Mykorrhizierung von über 90% vernachlässigbar gering sei. Möglicherweise sind die von Krajinski et al. (2000) beobachteten minimalen Unterschiede der Signalstärken auf das geringe Alter der untersuchten mykorrhizierten Pflanzen zurückzuführen. Es wäre durchaus denkbar, daß erst in einer späteren Phase der Symbiose eine verstärkte RNA-Synthese des AM-Pilzes in der Wirtswurzel erfolgt. Die Ergebnisse von Krajinski et al. (2000) deuten darauf hin, daß möglicherweise in Abhängigkeit vom Alter der

untersuchten Pflanzen und von der verwendeten Pilz-/Pflanze-Kombination Unterschiede hinsichtlich der Expression von rRNA-Genen des AM-Pilzes in der Symbiose auftreten könnten.
Die Resultate der in dieser Arbeit mit RNA aus mykorrhizierten Wurzeln durchgeführten Northern-Hybridisierungen, deren Signale gegen die 18S-rRNA von Tomate normalisiert worden waren, müßten bei einem pilzlichen rRNA-Anteil von über 40% an der isolierten Gesamt-RNA neu interpretiert werden. So lägen die Transkriptmengen von *Tomate-lo1*, *Tomate-hi2*, Nitratreduktase und Nitritreduktase in den Wurzeln der mykorrhizierten Pflanzen deutlich oberhalb der in Kontrollpflanzen auftretenden Transkriptmengen. Die verstärkte Expression von *Tomate-hi3* wäre ebenfalls weitaus deutlicher. Da die erhaltenen Daten zum rRNA-Anteil in mykorrhizierten Wurzeln derzeit nur eine Momentaufnahme aus der Entwicklung der Symbiose darstellen und auch mit weiteren Methoden (z.B. quantitativer RT-PCR) überprüft werden sollten, wurden diese noch nicht zur Normalisierung der erhaltenen Signalstärken benutzt. Dennoch machen die erhaltenen Resultate deutlich, daß bei der weiteren molekularen Untersuchung der arbuskulären Mykorrhiza der Quantifizierung des pilzlichen RNA-Anteils eine wichtige Rolle zukommen sollte.

4.10 Wachstum von *Glomus intraradices* ohne Wirt

Untersuchungen mit AM-Pilzen werden durch die symbiotische, obligat biotrophe Lebensweise dieser Organismen erheblich erschwert. Die Entwicklung eines Kultursystems mit Ri T-DNA transformierten Karottenwurzeln (Mugnier und Mosse, 1987; Bécard und Fortin, 1988) erlaubte nähere Untersuchungen zum Lebenszyklus (Chabot et al., 1992; Bago et al., 1998b; de Souza und Berbara, 1999) und zu funktionellen physiologischen Aspekten der Symbiose mit AM-Pilzen (Bécard und Piché, 1989a; Bago et al., 1996; Villegas et al., 1996; Johansen et al., 1996; Bago et al., 1998a; Bago et al., 1999; Pfeffer et al., 1999).
In Abwesenheit von Wirtswurzeln bilden auf Agar gekeimte AM-Sporen kaum verzweigte Hyphen mit starker Apikaldominanz („Runner"-Hyphen) von wenigen cm Länge, die nach kurzer Zeit (2-3 Wochen) ihr Wachstum einstellen (Mosse, 1987). Die Auswirkungen einer Vielzahl von Substanzen (Wurzelexsudate, Nährstoffe etc.) auf das Wachstum von AM-Pilzen wurden in der Hoffnung untersucht, Faktoren zu finden, die eine axenische Kultur von AM-Pilzen ermöglichen könnten (Daniels und Graham, 1976; Hepper, 1983; Elias und Safir, 1987; Glenn et al., 1988; Bécard und Piché, 1989b).
Als Voraussetzung für eine axenische Kultur müssen AM-Sporen, bevor sie auf Agar auskeimen, oberflächensterilisiert werden. Mayo et al. (1987) beschreiben bei keimenden AM-Sporen, die aufgrund unzureichender Sterilisierung mit möglicherweise Sporen-assoziierten Bakterien kontaminiert waren, einen Wachstum und Verzweigung der Hyphen fördernden Effekt. Die von Mayo et al. (1987) dargestellten Abbildungen zeigen nur in Anwesenheit von kontaminierenden Bakterien die Bildung von vermutlich wegen ihrer vesikelartigen Form als „sekundäre Vesikel" bezeichneten Strukturen. Ähnliches wird von Azcón-Aguilar et al. (1986) für das Wachstum von *Glomus mosseae* in Anwesenheit verschiedener, aus Böden isolierter Mikroorganismen beschrieben. Bei Experimenten mit steril gekeimten Sporen von *Glomus intraradices* konnten von Mosse (1987) Strukturen, die von ihr als „sekundäre Sporen" und „Arbuskel-ähnliche" Verzweigungen bezeichnet wurden, ausschließlich in Anwesenheit von transformierten Karottenwurzeln erhalten werden. Dies war auch ohne sichtbare Kolonisierung der Wurzeln durch die AM-Pilzhyphen der Fall. Allerdings wird von ihr eingeräumt, daß die dualen Wurzelkulturen nach einiger Zeit ebenfalls eine bakterielle Kontamination aufwiesen, die möglicherweise für die beobachteten Effekte verantwortlich gewesen sein könnte. Nach Oberflächen-

sterilisierung von *Glomus clarum*-Sporen konnten von Walley und Germida (1996) innerhalb der äußeren Sporenwand Bakterien nachgewiesen werden, die nur durch Inkubation der oberflächensterilisierten Sporen auf geeigneten Medien nachweisbar waren. Darüber hinaus sind innerhalb der Sporen Bakterien der Gattung *Burkholderia* gefunden worden, die dort möglicherweise als Endosymbionten fungieren (Bianciotto et al., 1996). Diese an oder innerhalb von Sporen vorkommenden Bakterien sind mit großer Wahrscheinlichkeit auch für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten bakteriellen Kontaminationen bei auskeimenden Sporen verantwortlich. In Anwesenheit der kontaminierenden Bakterien waren erhebliche morphologische Unterschiede zu steril wachsenden Hyphen von *Glomus intraradices* Sy167 zu beobachten. Die nach einiger Zeit einsetzende Bildung von Sporen, die ohne bakterielle Kontamination nicht beobachtet werden konnte, verlief sehr ähnlich zu der von de Souza und Berbara (1999) beschriebenen Entwicklung von Sporen von *Glomus clarum* in Karottenwurzelkultur. So entstehen die Sporen von *Glomus intraradices* Sy167 ebenfalls nicht terminal, sondern interkalar. In Wurzelkultur werden von Chabot (1992) und Bago et al. (1998ab) sowohl terminal als auch interkalar neugebildete Sporen von *Glomus intraradices* beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit mit Karottenwurzelkultur erhaltenen Sporen von *Glomus intraradices* Sy167 wurden jedoch ausschließlich interkalar gebildet. In ihrer Studie konnten de Souza und Berbara klar zeigen, daß es sich bei den in anderen Untersuchungen als „sporenähnliche Strukturen“, „sekundäre Sporen“, vegetative Sporen“ oder „sporenähnliche Vesikel“ bezeichneten Strukturen um juvenile Sporen handelt. So sind die in Anwesenheit der kontaminierenden Bakterien auftretenden Sporen von *Glomus intraradices* Sy167 durchaus mit denen in Wurzelkultur gebildeten vergleichbar.

Die Präparation der ohne Wirtswurzel gebildeten Sporen aus dem sie umgebenden Agar ist recht schwierig, so daß nur wenige äußerlich intakt erscheinende Sporen gewonnen werden konnten. Die Inokulation mit nur etwa zehn Sporen pro Pflanze kann aber auch mit aus Topfkulturen stammenden Sporen durchaus problematisch sein. Somit erlauben die bislang durchgeführten Reinfektions-Experimente noch keine fundierten Aussagen über die funktionelle Intaktheit der ohne Wurzel-Co-Kultur gebildeten Sporen. Daher müssen weiterführende Untersuchungen die Keimungsfähigkeit der ohne Wirtswurzel neugebildeten Sporen sowie deren Reinfektiosität und damit den Vollzug des pilzlichen Lebenszyklus nachweisen.

Die zwischen Ausgangssporen und neugebildeten Sporen auftretenden Größenunterschiede werden auch bei Kultur mit transformierten Karottenwurzeln beschrieben (Chabot et al., 1992; Pawlowska et al., 1999). Allerdings könnten dafür bei den Ansätzen ohne Wirtswurzeln, neben der beobachten Austrocknung der Agarplatten, möglicherweise auch toxische bakterielle Stoffwechselprodukte verantwortlich sein, die nach einiger Zeit im Medium akkumulieren, und das weitere Wachstum der AM-Pilze beeinträchtigen.

Die beobachteten Unterschiede beim Wachstum mit und ohne Wirtswurzel hinsichtlich der Sporenentwicklung könnte aber auch auf eine zeitlich verzögerte Fähigkeit zur Nährstoffaufnahme der ohne Wirtswurzel wachsenden AM-Pilze hindeuten. Das zum Teil intensive Wachstum der Hyphen in Anwesenheit der Bakterien läßt sich wegen der feinen, dreidimensional im Agar wachsenden Hyphen nicht unmittelbar quantifizieren. Dieses Wachstum kann jedoch nicht ausschließlich mit der Nutzung des Nährstoffreservoirs (überwiegend Lipide) der Ausgangssporen erklärt werden. Um überhaupt ein solches Wachstum zu ermöglichen, muß Stickstoff assimiliert und Kohlenstoff aufgenommen werden. Ein weiterer Gesichtspunkt, der diese Vermutung stützt, ist die Ausbildung von extraradikalen ALS (arbuscule-like-structure = Arbuskel-ähnliche-Struktur), die bisher ausschließlich bei in Wurzelkultur gewachsenen AM-Pilzen als charakteristische Strukturen beschrieben wurden (Chabot, 1992; Bago et al., 1998b; Karashandov et al., 2000). Allerdings weisen die in Anwesenheit von Bakterien und ohne Wirtswurzel gebildeten ALS deutliche morphologische Unterschiede zu den in Karottenwurzelkultur mit *Glomus intraradices* auftreten-

den ALS auf. Die knäuelige, knötchenartige Struktur der ohne Wirtswurzel mit Bakterien entstandenen ALS-Hyphen ist dabei das markanteste Unterscheidungsmerkmal zu den glatt und eher strauchartig, klar dichotom verzweigten ALS in der Karottenwurzelkultur. Die Bildung von Sporen ist bei beiden Formen oftmals mit diesen Strukturen assoziiert. Diese ALS werden von Bago et al. (1998a) als BAS (= branched absorbing structure) bezeichnet, um sie als Bestandteil des extraradikalen Myzels gegen die in den Wirtswurzeln ausgebildeten Arbuskeln abzugrenzen. Nach Bago et al. (1998a) ist *Glomus intraradices* nicht in der Lage, diese Strukturen ohne Kontakt mit einer Wirtswurzel auszubilden. Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen BAS und den in Anwesenheit der kontaminierenden Bakterien gebildeten ALS ist das Auftreten dieser Strukturen in oftmals nahezu regelmäßigen Abständen an extraradikalen Hyphen. Interessanterweise ist für die intraradikalen Arbuskeln ebenfalls ein Auftreten in nahezu gleichmäßigen Intervallen an intraradikalen Hyphen beschrieben (Toth et al., 1990). Eine von Bécard und Piché (1989c) aufgestellte Hypothese besagt, daß das zur Ausbildung von BAS führende Signal mit der Bildung von Arbuskeln und mit der Aufnahme von C-Metaboliten verbunden sei. Mit monoxenischen Karottenwurzelkulturen mit *Glomus intraradices* konnten Pfeffer et al. (1999) zeigen, daß ausschließlich die pilzlichen intraradikalen Strukturen Kohlenstoff in Form von Hexosen aufnehmen und Lipide synthetisieren, während die extraradikalen Strukturen an diesen Prozessen nicht beteiligt sind. In der asymbiotischen Phase sind AM-Pilze zwar in der Lage, Hexosen und Acetat aufzunehmen, können diese aber nur in stark beschränktem Maße in Lipide umwandeln (Bago et al., 1999). Somit könnte die asymbiotische Wachstumslimitierung der AM-Pilze auf eine beschränkte Fähigkeit zur Aufnahme oder Metabolisierung von Kohlenstoff zurückgeführt werden. Diese Blockade zwischen präsymbiotischer und symbiotischer Phase wird in der Literatur durch zwei unterschiedliche Hypothesen erklärt: 1. Verlust genetischer Ausstattung im Verlauf der Co-Evolution mit den Wirtspflanzen, und 2. die fehlende Fähigkeit in Abwesenheit von Wirtswurzeln die den Pilz ernährenden Strukturen (Arbuskeln) auszubilden. Diese Blockade in der pilzlichen Entwicklung wird erst durch die Anwesenheit bzw. den Kontakt mit der Wirtswurzel durchbrochen (Bago et al., 1996).

Da in Anwesenheit der kontaminierenden Bakterien, die als *Paenibacillus* sp. identifiziert werden konnten (DSMZ, Braunschweig; ID99-617/618), Sporen gebildet werden, die wie auf den dargestellten Abbildungen (Kap.3.12) zu erkennen ist, typischerweise ebenfalls mit Lipiden gefüllt sind, liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei den dort auftretenden ALS möglicherweise auch in physiologischer Hinsicht um Arbuskel-ähnliche, vielleicht sogar Arbuskel-homologe Strukturen außerhalb der Wirtswurzel handeln könnte. Die durch die Anwesenheit von *Paenibacillus* hervorgerufene Stimulation des Wachstums und die morphologischen Veränderungen könnten auf eine für *Glomus intraradices* verbesserte Mobilisierung von Nährstoffen zurückgeführt werden. Da die beschriebenen morphologischen Veränderungen aber auch ohne direkten physischen Kontakt von Bakterien und *Glomus intraradices* beobachtet werden können (Katharina Janetta, Köln; persönliche Mitteilung), besteht weiterhin die Möglichkeit, daß eine von *Paenibacillus* sp. gebildete und an das Medium abgegebene, gut diffusible oder leicht flüchtige Substanz, als Signal fungiert, das zur Ausbildung der ALS führt.

Budi et al. (1999) beschreiben ein die Kolonisierung in der dualen Karottenwurzelkultur förderndes, aus der Mykorrhizosphäre von *Sorghum bicolor* stammendes *Paenibacillus*-Isolat, das darüber hinaus eine antagonistische Wirkung gegenüber pilzlichen Wurzelpathogenen aufweist. Bakterien der Gattung *Paenibacillus* sind also offenbar Bestandteil der AM-assoziierten Bakterienflora und könnten dort eine spezifische Funktion erfüllen. Das Pflanzenwachstum fördernde *Paenibacillus polymixa* ist darüber hinaus in der Lage, die Expression streßresponsiver Gene in *Arabidopsis thaliana* zu verändern (Timmusk und Wagner, 1999).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Effekte ergibt sich aus Untersuchungen von Bécard und Piché (1989b), die eine deutliche Stimulation des Wachstums von Hyphen von *Gigaspora margarita* mit erhöhten CO_2-Konzentrationen beobachten konnten. Erhöhte CO_2-Konzentrationen könnten in der präsymbiotischen Phase die Fixierung von CO_2 durch den anaplerotischen Stoffwechsel und somit die Synthese von Kohlenhydraten aus den in den Sporen gespeicherten Lipiden ermöglichen. Eine durch die Atmungsaktivität der Bakterien hervorgerufene gesteigerte CO_2-Konzentration könnte somit durchaus für die beschriebenen Effekte verantwortlich sein. Allerdings wurden von Bécard und Piché (1989b) keine morphologischen Unterschiede in Abhängigkeit von einer erhöhten CO_2-Konzentration festgestellt.
Durch Mykorrhizierung hervorgerufene Veränderungen in der Zusammensetzung der Rhizosphärenflora konnten mehrfach beschrieben werden (Bagyaraj und Menge, 1978; Bansal und Mukerji, 1994; Andrade et al., 1997). Darüber hinaus ist ebenso bekannt, daß viele Rhizobakterien in der Lage sind, Wachstum und Nährstoffaufnahme von Pflanzen zu verbessern (Höflich et al., 1994) und die Mykorrhizierung von Pflanzen zu fördern (Fester et al., 1999). Rhizobakterien sind aber auch in der Lage, die Genexpression von AM-Pilzen zu beeinflussen (Requena et al., 1999).
Durch den Zusatz von *Paenibacillus* sp. kann offensichtlich die Blockade zwischen präsymbiotischer und symbiotischer Phase in der Entwicklung von AM-Pilzen überbrückt werden. Inwieweit *Paenibacillus* sp. in der Lage ist, die physiologischen Eigenschaften von AM-Pilzen zu verändern oder zu beeinflußen, und welchen Beitrag diese Bakterien zur Ausbildung und Aufrechterhaltung der arbuskulären Mykorrhiza leisten, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

4.11 Ausblick auf weitere Untersuchungen

Der Nachweis und die Lokalisation von Plasmamembran-Transportproteinen ist innerhalb der arbuskulären Mykorrhiza von besonderem Interesse. Der Nährstoffaustausch zwischen den beiden Symbiosepartnern in der Wirtswurzel, der Schnittstelle der beiden Organismen, wurde bisher überwiegend mit physiologisch-biochemischen Methoden untersucht. Erst innerhalb der letzten fünf Jahre wurden einzelne Aspekte der arbuskulären Mykorrhiza mit molekularbiologischen Methoden bearbeitet. Dabei wird die Untersuchung dieser Symbiose, auch mit molekularbiologischen Methoden, durch die obligat biotrophe Lebensweise der AM-Pilze behindert. Dennoch eröffnet die Anwendung molekularbiologischer Methoden, in Kombination mit modernen physiologischen Methoden, eine neue Sichtweise, auch im Hinblick auf die experimentelle Herangehensweise zur Analyse der arbuskulären Mykorrhiza.
Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Resultate deuten darauf hin, daß AM-Pilze in der Lage sind, die Nitratversorgung ihrer Wirtspflanzen zu verbessern. Erstmals konnte ein Einfluß der Mykorrhizierung auf die Expression eines mutmaßlichen pflanzlichen Nitrattransportergens (*Tomate-hi3*) gezeigt werden. Die genaue Funktion von *Tomate-hi3* als Nitrattransporter muß dabei allerdings noch gezeigt werden. Hierzu ist zunächst die Isolierung einer vollständigen cDNA dieses Gens notwendig. Die Injektion von *in vitro* synthetisierter *Tomate-hi3*-mRNA oder doppelsträngiger cDNA (in einem geeigneten Expressionsvektor) in *Xenopus*-Oocyten (Miller und Zhou, 2000) und die anschließende Messung von nitratabhängigen Strömen könnte die Beteiligung von *Tomate-hi3* am Nitrataufnahmesystem von Tomate bestätigen. Die heterologe Komplementation Nitrattransport-defizienter Hefemutanten mit *Tomate-hi3* könnte alternativ Hinweise auf Funktion und Substratspezifität von *Tomate-hi3* erbringen.

Die Untersuchungen von Zhuo et al. (1999) lassen vermuten, daß die Expression von Nitrattransportergenen entwicklungsspezifisch reguliert wird. Darüber hinaus ist zu erwarten, daß die Expression der Nitrattransportergene, wie auch der NR- und NiR-Gene, von verschiedenen Umweltfaktoren (Nährstoffe im Boden, Lichtstärke und -menge, pH-Wert, Wassergehalt des Bodens etc.) abhängig ist. Unter Verwendung der vorhandenen Gensonden könnten mit Northern-Hybridisierungen die Auswirkungen dieser Umweltfaktoren in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Symbiose untersucht werden. Insbesondere die Expression von Nitrattransportergenen in mykorrhizierten Pflanzen unter Trockenstreß, der offenbar einen verstärkten Nitrattransport vom AM-Pilz zur Wirtspflanze bewirkt (Frey und Schüepp, 1993; Tobar et al., 1994 a,b; Subramanian und Charest, 1999), sollte dabei Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.
Die Methode der *In situ*-RNA-Hybridisierung liefert eindrucksvolle und wertvolle Hinweise zur Genexpression in Geweben, ist aber durch ausschließliche Betrachtung von Transkripten hinsichtlich ihrer Aussagekraft limitiert. Die bei Transmembranproteinen oftmals problematische Herstellung von Antikörpern würde hingegen die Lokalisierung der Proteine im Gewebe bis in den subzellulären Bereich erlauben.
Alternativ zur *In situ*-Hybridisierung könnte die Expression von *Tomate-hi3* durch transgene Expression von Promoter-Reportergen-Konstrukten mit β-Glucuronidase (GUS), Luciferase (LUC) oder „green fluorescent protein“ (GFP) in der Wurzel untersucht werden. Voraussetzung dafür ist allerdings die genaue Kenntnis der Promotersequenz von *Tomate-hi3*. Diese Methode hätte gegenüber der sehr aufwendigen *In situ*-Hybridisierung einen großen Vorteil. Nach Herstellung der transgenen Pflanzen könnte die Expression von z.B. *Tomate-hi3* innerhalb einer kurzen Zeitspanne in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten oder unter unterschiedlichen Umweltbedingungen (z.B. N-Mangel, Trockenstreß etc.) gewachsenen Pflanzen untersucht bzw. nachgewiesen werden. Auch der Einfluß verschiedener AM-Isolate auf die beobachteten Effekte könnte so unter gleichen Umweltbedingungen untersucht werden.
Versuchsreihen mit weiteren mykorrhizierbaren Spezies, bei denen mittlerweile eine Vielzahl verschiedener Nitrattransporter identifiziert werden konnte (z.B. Gerste), würden Aufschluß darüber geben, ob die beschriebenen Effekte spezifisch für die Wirtspflanze, respektive die Kombination von Wirtspflanze und AM-Pilz sind.
Darüber hinaus wären Untersuchungen zu einer möglichen systemischen Expression von *Tomate-hi3* in mykorrhizierten Wurzeln außerordentlich interessant. Hierzu könnten sogenannte „split-root“-Kultursysteme, mit getrennten mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Teilen des Wurzelsystems, wie von Burleigh und Harrison (1999) eingesetzt, verwendet werden.
Die in dieser Arbeit, bezüglich der Rolle der AM-Pilze bei der Stickstoffversorgung ihrer Wirtspflanzen erhaltenen Ergebnisse werfen weitere Fragen auf. So beschränkt sich offenbar der Einfluß der Mykorrhizierung auf die Expression von Nitrattransportergenen auf den mutmaßlichen high-affinity Nitrattransporter *Tomate-hi3* und möglicherweise andere, in dieser Arbeit nicht untersuchte weitere Nitrattransportergene. Erst wenn alle putativen Nitrattransporter von Tomate identifiziert und ihre physiologischen und regulatorischen Charakteristika bekannt sind, können Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Mechanismen der differentiellen Regulation von Nitrattransportergenen in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung gezogen werden. Dann könnte die Herstellung von transgenen, in ihrer Nitrataufnahme defizienten Pflanzen und deren anschließender Einsatz in Mykorrhizierungs-Experimenten wertvolle Erkenntnisse zur molekularen Grundlage der Stickstoffversorgung der AM-Wirtspflanze liefern. Ähnliches gilt für Pflanzen, die keine Nitrat- oder Nitritreduktaseaktivität besitzen. In diesem Zusammenhang sollte dann auch die Expression von Ammoniumtransportern und deren Zusammenspiel mit den Nitrattransportern bei der Stickstoffversorgung der Wirtspflanze in der arbuskulären Mykorrhiza untersucht

werden. Mikroarray-Studien ermöglichen derzeit die gleichzeitige Expressionsanalyse mehrerer tausend Gene von *Arabidopsis thaliana*. Erst durch die weitere Genomanalyse mykorrhizierbarer Pflanzen mit relativ kleinem Genom (*Medicago truncatula*) könnte diese neue Technologie in Kombination mit quantitativer RT-PCR auch bei der Untersuchung der arbuskulären Mykorrhiza Anwendung finden.
Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Analyse der arbuskulären Mykorrhiza ist die genetische Ausstattung des pilzlichen Symbiosepartners. Aus AM-Pilzen konnten bisher auch mit gerichteten, PCR-basierenden Ansätzen nur wenige Gene isoliert werden, bei denen die mutmaßliche Funktion ihrer Genprodukte durch Homologievergleiche zu bekannten Proteinen anderer Spezies ermittelt werden konnte (Kaldorf et al, 1994; Harrison und van Buuren, 1995; Franken et al., 1997; Burleigh und Harrison, 1998; Requena et al., 1999). Ein erhebliches Problem besteht darin, reines pilzliches Ausgangsmaterial in ausreichender Menge zur Isolierung von DNA und RNA zu erhalten. Sowohl das Kompartimentsystem, das die Isolierung von relativ großen Mengen Myzel ermöglicht, als auch das Karottenwurzel-Kultursystem bieten hervorragende Alternativen zur herkömmlichen Isolierung von AM-Pilz-Material aus einfachen Topfkulturen.
Die heterologe Durchmusterung von cDNA- oder genomischen AM-Pilz-Banken, die ausgehend von Material dieser beiden Kultursysteme erstellt werden können, würde möglicherweise die Identifizierung einer Vielzahl weiterer Gene (z.B. Nitrattransportergene) ermöglichen. Die weitere Einbeziehung des pilzlichen Symbiosepartners in die molekularbiologisch geprägten Untersuchungen zur Analyse der arbuskulären Mykorrhiza ist eine Hauptaufgabe zukünftiger Studien.

Das Karottenwurzelsystem könnte als Modell für die Untersuchung von pilzlichen rRNA-Anteilen an der Wurzel-Gesamt-RNA zu verschiedenen Zeitpunkten der Mykorrhiza-Entwicklung eingesetzt werden. Parallel zu diesem artifiziellen System sollte allerdings die Mykorrhizierung von Pflanzen in Topfkultur untersucht werden.
Dazu könnte neben herkömmlichen Northern-Analysen die Methode der quantitativen RT-PCR, insbesondere die sogenannte „Real-Time PCR-Quantifizierung von Nukleinsäuren" (Heid et al., 1996) eingesetzt werden. Vor allem bei geringen cDNA-Mengen wäre damit noch eine Quantifizierung von Transkripten, also auch von pilzlicher rRNA möglich. Voraussetzung hierfür wäre die Entwicklung von pilz- und pflanzenspezifischen Primerkombinationen. Diese Untersuchungen werden zukünftig im Labor durchgeführt werden können, da ein Gerät zur „Real-Time PCR-Quantifizierung" kürzlich bereitgestellt worden ist.

Zur weiteren Untersuchung der bei der Co-Kultur von *Glomus intraradices* mit *Paenibacillus* sp. auftretenden Effekte müßte CO_2 als spezifischer Effektor ausgeschlossen werden. Dies könnte einerseits durch Begasung der keimenden Sporen mit CO_2 in An- und Abwesenheit von *Paenibacillus* oder durch stetiges Entfernen von CO_2 aus der Umgebung (z.B. durch "KOH-Fallen"; Bécard und Piché, 1989) untersucht werden. Der nächste Schritt bestünde in der Identifizierung des Effektors mit biochemischen Methoden. Diese Untersuchungen werden jedoch durch das außerordentlich langsame Wachstum der AM-Pilze behindert.
Erst eine Reinfektion von Pflanzenwurzeln durch die in Co-Kultur mit *Paenibacillus* gebildeten Sporen würde deren Homologie zu in Anwesenheit von Wirtswurzeln entstandenen Sporen bestätigen. Hierzu sind Experimente unter Verwendung eines ohne Hitzeeinwirkung verflüssigbaren Kulturmediums (Doner und Bécard, 1991), das eine unproblematische Isolierung der Sporen aus dem festen Medium erlaubt, geplant. Dabei sollen die neugebildeten Sporen auf ihre Keimungsfähigkeit überprüft werden. Verläuft dieser Test erfolgreich, sind weitere Reinfektionsexperimente unter anderem mit Ri T-DNA transformierten Karottenwurzeln geplant.

5. Zusammenfassung

1. Durch Vergleiche publizierter Sequenzen von low- und high-affinity Nitrattransportergenen höherer Pflanzen wurden hochkonservierte Bereiche identifiziert. Diese wurden als Grundlage zur Synthese degenerierter Oligonukleotidprimer verwendet. Mit diesen Primerpaaren konnten Segmente von low- und high-affinity Nitrattransportergenen aus *Arabidopsis*, Tabak und Tomate amplifiziert werden. In ähnlicher Weise wurden Segmente eines Nitratreduktase- und eines Nitritreduktasegens von Tomate amplifiziert.

2. Die erhaltenen PCR-Segmente wurden kloniert und teilweise sequenziert. Die erhaltene Sequenzinformation erlaubte die Durchführung von 3´-RACE-Experimenten, die zur Klonierung von 3´-nicht-translatierten Bereichen je zweier low- und high-affinity Nitrattransportergene (*Tomate-lo1*, *Tomate-lo2*, *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3*) von Tomate führten. Wie Sequenzvergleiche zeigen, handelt es sich bei *Tomate-hi3* um ein bisher unbekanntes zu high-affinity Nitrattransportern homologes Gen aus Tomate.

3. Durch Kreuzhybridisierungsexperimente konnte gezeigt werden, daß die Sequenzunterschiede zwischen den jeweiligen RACE-PCR-Segmenten ausreichen, um eine genspezifische Hybridisierung zu ermöglichen. Die heterologe Hybridisierung zwischen diesen Sonden für die untersuchten low- und high-affinity Nitrattransportergene ergibt Signalstärken von weniger als 0,1% im Vergleich zu den bei homologer Hybridisierung erhaltenen Signalintensitäten. Damit konnten die PCR-Segmente als Gensonden zur Untersuchung der Expression der betreffenden Gene in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen eingesetzt werden.

4. Southern-Hybridisierungen bestätigen die Identität von *Tomate-hi3* als Bestandteil des Genoms von Tomate und erlauben eine deutliche Abgrenzung zu den kürzlich publizierten Sequenzen von *Tomate-hi1* und *Tomate-hi2*.

5. Untersuchungen zur Nitratinduzierbarkeit von *Tomate-lo1*, *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* ergaben, daß alle untersuchten Nitrattransportergene durch exogenes Nitrat induzierbar sind und daher deutlich erhöhte Transkriptmengen nach einer Nitratgabe aufweisen.

6. Die Expression der untersuchten Nitrattransportergene ist überwiegend auf die Wurzel beschränkt. In Northern-Analysen, durch RT-PCR- und 3´-RACE-Experimente konnte gezeigt werden, daß low- und high-affinity Nitrattransportergene von Tomate auch in oberirdischen Pflanzenteilen exprimiert werden.

7. Durch Northern-Hybridisierungen wurde gezeigt, daß die Expression von *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* durch exogen appliziertes NH_4^+ deutlich reprimiert wird, wohingegen bei *Tomate-lo1* keine wesentlichen Effekte zu beobachten sind. *Tomate-hi3* unterscheidet sich bezüglich der Expression mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle deutlich von *Tomate-hi2*. Dabei wird *Tomate-hi3* offenbar durch Glutamin nicht so stark reprimiert wie *Tomate-hi2*. Die intensivsten Hybridisierungssignale traten für die beiden high-affinity Nitrattransportergene *Tomate-hi2* und *Tomate-hi3* mit der Kombination von Nitrat und

Glutamin als Stickstoffquelle auf. Glutamin als einzige Stickstoffquelle führt ebenfalls zur Repression des low-affinity Nitrattransportergens *Tomate-lo1*.

8. Gensonden für die Nitrattransportergene *Tomate-lo1* und *Tomate-hi3* wurden bei *In situ*-RNA-Hybridisierungen zur Lokalisierung der Transkripte beider Gene in Tomatenwurzeln eingesetzt. Die Expression von *Tomate-lo1* konnte in jungen Wurzelabschnitten in Zellen der Wurzelspitze und der Rhizodermis nachgewiesen werden. In älteren Wurzelbereichen treten Signale verstärkt in den Zellen des Cortex auf. *Tomate-hi3* wird ebenfalls in Zellen der Wurzelspitze und in jungen wie auch älteren Wurzelabschnitten in Zellen der Rhizodermis exprimiert.

9. In den Wurzeln mykorrhizierter Tomatenpflanzen wird *Tomate-hi3*, im Gegensatz zu nicht-mykorrhizierten Wurzeln, zusätzlich zur Rhizodermis in weiter innen gelegenen Schichten des Rindenparenchyms älterer Wurzelabschnitte exprimiert. Eine verstärkte Expression in Arbuskel-enthaltenden Zellen konnte nicht beobachtet werden.

10. Durch Northern-Hybridisierungen konnte gezeigt werden, daß die Transkriptmenge von *Tomate-hi3* in mykorrhizierten Tomatenwurzeln, im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Wurzeln, etwa zweifach erhöht ist. Die Expression der beiden weiteren untersuchten Nitrattransportergene *Tomate-lo1* und *Tomate-hi2* wird durch eine Mykorrhizierung unter den gewählten Bedingungen offenbar nur in geringem Maße beeinflußt.

11. Die PCR-Segmente aus den Nitratreduktase- und Nitritreduktasegenen von Tomate wurden als Sonden eingesetzt, um mit Hilfe von Northern-Analysen den Einfluß einer Mykorrhizierung auf die Expression dieser Gene zu untersuchen. Im Vergleich zu den Wurzeln der Kontrollpflanzen ist die Expression des Nitritreduktasegens in den mykorrhizierten Wurzeln leicht erhöht, während kein deutlicher Unterschied für das Nitratreduktasegen zu erkennen ist. In den Blättern mykorrhizierter Pflanzen sind für beide Gene leicht erhöhte Transkriptmengen zu beobachten.

12. Die Nitratreduktase-Aktivität mykorrhizierter Tomatenpflanzen ist, im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen, in Wurzeln und Blättern leicht erhöht.

13. Durch Northern-Hybridisierungen mit einer Sonde für ein Nitratreduktasegen aus *Glomus intraradices* Sy167 konnte gezeigt werden, daß dieses in mykorrhizierten Tomatenwurzeln exprimiert wird.

14. Erstmals konnte eine *In vitro*-NR-Aktivität mit Rohextrakten des extraradikalen Myzels von *Glomus intraradices* nachgewiesen werden.

15. RNA-Dot-Blot-Hybridisierungen deuten auf einen pilzlichen rRNA-Anteil von bis zu 50% in mit *Glomus intraradices* Sy167 mykorrhizierten Tomatenwurzeln hin.

16. Die Co-Kultur des als obligat biotroph geltenden AM-Pilzes *Glomus intraradices* Sy167 mit dem AM-assoziierten Bakterium *Paenibacillus* sp., führt zu

deutlich verstärktem Wachstum, morphologischen Veränderungen und zur Ausbildung von Sporen.

6. Literaturverzeichnis

Alexander T., Meier R., Toth R., Weber H.C. (1988) - Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. - New Phytol. 110, 363-370

Alten, von,H.; Beeck,C.; Schönbeck,F. (1990) - Aspects of infectivity and efficiency of VA-mycorrhiza inoculum on expanded clay, Abstracts: 8th NACOM (North American Conference On Mycorrhizae) - Innovation and hierachical integration - Jackson, Wyoming, September 1990

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) – Basic local alignment search tool – J. Mol. Biol. 215, 403-410

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) – Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein

Amarasinghe B.H.R.R., de Bruxelles G.L., Braddon M., Onyeocha I., Forde B.G., Udvardi M.K. (1998) – Regulation of *GmNRT2* expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*) – Planta 206, 44-52

Ambler,J.R.; Young,J.L. (1977) - Techniques for determining root length infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae - Soil Sci. Soc. Am. J. 41, 551-556

Ames R.N., Reid C.P.P., Porter L.K., Cambardella C. (1983) - Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ^{15}N-labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus - New Phytol. 95, 381-396

Andrade G., Mihara K.L., Linderman R.G., Bethlenfalvay G.J. (1997) – Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular mycorrhizal fungi – Plant Soil 192, 71-79

Angerer L.M., Cox K.H., Angerer R.C. (1987) - Demonstration of tissue-specific gene expression by *in situ* hybridization - Methods Enzymol. 152, 649-661

Azcón R., Gomez M., Tobar R. (1992) – Effects of nitrogen source on growth, nutrition, photosynthetic rate and nitrogen metabolism of mycorrhizal and phosphorus-fertilized plants of *Lactuca sativa* L. – New Phytol. 121, 227-234

Azcón-Aguilar C., Diaz-Rodriguez R.M., Barea J.-M. (1986) – Effect of soil micro-organisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* – Trans. Br. Mycol. Soc. 86, 337-340

Back E., Burkhart W., Moyer M., Privalle L., Rothstein S. (1988) – Isolation of cDNA clones coding for spinach nitrite reductase: Complete sequence and nitrate induction – Mol. Gen. Genet. 212, 20-26

Bago B., Azcón-Aguilar C., Goulet A., Piché Y. (1998a) – Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi – New Phytol. 139, 375-388

Bago B., Azcón-Aguilar C., Piché Y. (1998b) – Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions – Mycologia 90, 52-56

Bago B., Pfeffer P.E., Douds D.D.Jr., Brouillette J., Bécard G., Shachar-Hill Y. (1999) – Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy – Plant Physiol. 121, 263-271

Bago B., Vierheilig H., Piché Y., Azcón-Aguilar C. (1996) – Nitrate depletion and pH-changes induces by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture – New Phytol. 133, 273-280

Bagyaraj D.J., Menge J.A. (1978) – Interactions between a VA mycorrhiza and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora and plant growth – New Phytol. 80, 567-573

Bansal M., Mukerji K.G. (1994) – Positive correlation between AM-induced changes in root exudation and mycorrhizosphere mycoflora – Mycorrhiza 5, 39-44

Barea J.M., Azcón-Aguilar C., Azcón R. (1987) - Vesicular-arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N_2 fixation and N uptake from soil as assessed with a ^{15}N technique under field conditions - New Phytol. 106, 717-725

Bécard G., Fortin J.A. (1988) – Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA-transformed roots – New Phytol. 108, 211-218

Bécard G., Piché Y. (1989a) – Physiological factors determining vesicular-arbuscular mycorrhizal formation in host and non-host Ri T-DNA transformed roots – Can. J. Bot. 68, 1260-1264

Bécard G., Piché Y. (1989b) – Fungal growth stimulation by CO_2 and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis – Appl. Environ. Microbiol. 55, 2320-2325

Bécard G., Piché Y. (1989c) – New aspects on the aquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* – New Phytol. 112, 77-83

Bécard G., Douds D.D., Pfeffer P.E. (1995) – Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO_2 and flavonols – Appl. Environ. Microbiol. 58, 821-825

Bécard G., Taylor L.P., Douds D.D. Jr., Pfeffer P.E., Doner L.W. (1995) – Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses – Mol. Plant-Microbe Interact. 8, 252-258

Bianciotto V., Bandi C., Minerdi D., Sironi M., Tichy H.V., Bonfante P. (1996) – An obligate endosymbiontic mycorrhizal fungus itself harbours obligate endobacteria - Appl. Environ. Microbiol. 62, 3005-3010

Birnboim H.C., Doly J. (1979) - A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA - Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523

Bonfante P., Bergero R., Uribe X., Romera C., Rigau J., Puigdomenech P. (1996) – Transcriptional activation of a maize α-tubulin gene in mycorrhizal maize and transgenic tobacco plants – The Plant Journal 9, 737-743

Bonfante-Fasolo P. (1984) – Anatomy and morphology of VA-mycorrhizae – In :Powell C.L., Bagyaraj D.J., eds. VA-Mycorrhiza. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 5-33

Bothe H. (1993) – Metabolism of inorganic nitrogen compounds – Prog. Bot. 54, 201-217

Budi S.W., van Tuinen D., Martinotti G., Gianinazzi S. (1999) – Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizospere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens – Appl. Environ. Microbiol. 65, 5148-5150

Burleigh S.H., Harrison M.J. (1999) – The down-regulation of *Mt4*-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots – Plant Physiol. 119, 241-248

Campbell W.H. (1988) – Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants – Physiol. Plant. 74, 214-219

Cardenas-Navarro R., Adamowicz S., Robin P. (1998) – Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: test of a feedback-based model – J. Exp. Bot. 49, 721-730

Carnero Diaz E., Martin F., Tagu D. (1996) – Eucalypt α-tubuline: cDNA cloning and increased level of transcripts in ectomycorrhizal root system – Plant Mol. Biol. 31, 905-910

Carnero Diaz E., Tagu D., Martin F. (1997) – Ribosomal DNA internal transcribed spacers to estimate the proportion of *Pisolothus tinctorius* and *Eucalyptus globulus* RNAs in ectomycorrhiza – Appl. Environ. Microbiol. 63, 840-843

Chabot S., Bécard G., Piché Y. (1992) – Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture – Mycologia 84, 315-321

Chung C.T., Miller R.H. (1993) - Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells - Methods Enzymol. 218, 43

Clarkson D.T. (1986) – Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells: a review of current ideas and methodology. – In: Lambers H., Neeteson J.J., Stulen I. (Eds.), Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants. Martinus Nijhoff, Boston, MA, 3-27

Cox G., Tinker P.B. (1976) - Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas I. The arbuscule and phosphorus transfer: a quantitative ultrastructural study - New Phytol. 77, 371-378

Crawford N.M., Arst H.N.Jr (1993) – The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants – Annu. Rev. genet. 27, 115-146

Crawford N.M., Glass A.D.M. (1998) – Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants – Trends Plant Sci. 3, 389-395

Daft M.J.; Nicolson T.H. (1969) - Effect of Endogone mycorrhiza on plant growth. II. Influence of soluble phosphate on endophyte and host in maize - New Phytol., 68, 945-952

Daniels B.A., Graham S.O. (1976) – Effects of nutrition and soil extracts on germination of *Glomus mosseae* spores – Mycologia 68, 108-115

Daniel-Vedele F., Dorbe M.-F., Caboche M., Rouzé P. (1989) – Cloning and analysis of the tomato nitrate reductase-encoding gene: protein domain structure and amino acid homologies in higher plants – Gene 85, 371-380

Danneberg G., Latus C., Zimmer W., Hundeshagen B., Schneider-Poetsch Hj., Bothe H. (1992) - Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.) - J. Plant Physiol. 141, 33-39

Daram P., Brunner S., Persson B.L., Amrhein N., Bucher M. (1998) – Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato – Planta 206, 225-233

de Souza F.A., Berbara R.L.L. (1999) – Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots – Mycologia 91, 343-350

Dehne,H.W.; Backhaus,G.F. (1986) - The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in plant production. I. Inoculum production - J. of Plant Diseases and Protection 93, 415-424

Deng M.-D., Moureaux T., Cherel I., Boutin J.-P., Caboche M. (1991) – Effects of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase – Plant Physiol. Biochem. 29, 239-247

Doner L.W., Bécard G. (1991) – Solubilization of gellan gels by chelation of cations – Biotechnol. Tech. 5, 25-29

Doyle J.J., Doyle J.L. (1990) - Isolation of plant DNA from fresh tissue - Focus 12, 13-15

Dumas-Gaudot E., Guilliaume P., Tahiri-Alaoui A., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (1994) – Changes in polypeptide patterns in tobacco roots colonized by two *Glomus* species – Mycorrhiza 4, 215-221

Eggermont K., Goderis I.J., Broekaert W.F. (1996) - High-throughput RNA extraction from plant samples based on homogenisation by reciprocal shaking in the presence of a mixture of sand and glass beads - Plant Molecular Biology Reporter 14(3), 273-279

Elias K.S., Safir G.R. (1987) – Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates – Appl. Environ. Microbiol. 53, 1928-1933

Enstone D.E., Person C.A. (1992) – The apoplastic permeability of root apices – Can. J. Bot. 70, 1502-1512

Esch H., Hundeshagen B., Schneider-Poetsch Hj., Bothe H. (1994) – Demonstration of abscisic acid in spores and hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* and in the N2-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis* – Plant Science 99, 9-16

Eschrich W. (1976) - Strasburger´s Kleines Botanisches Praktikum für Anfänger 17. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York

Faure J.D., Vincentz M., Kronenberger J., Caboche M. (1991) – Co-regulated expression of nitrate and nitrite reductases – Plant J. 1, 107-113

Fedorcsak I., Ehrenberg L. (1966) – Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases – Acta Chem. Scand. 20, 107ff

Fester T., Maier W., Strack D. (1999) – Accumulation of secondary compounds in barley and wheat roots in response to inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus and co-inoculation with rhizosphere bacteria – Mycorrhiza 8, 241-246

Filleur S., Daniel-Vedèle F. (1999) – Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display – Planta 207, 461-469

Forde B.G. (2000) – Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation – Biochim. Biophys. Acta 1465, 219-235

Frank B.A. (1885) - Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze - Ber. Dtsch. Bot. Ges., 3, 128-145

Franken P., Lapopin L., Meyer-Gauen G., Gianinazzi-Pearson V. (1997) – RNA-accumulation and genes expressed in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora rosea* – Mycologia 89, 293-297

Frey B., Schüepp H. (1993) - Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. - New Phytol. 124, 221-230

Frohman, M.A. (1990) – RACE: Rapid amplification of cDNA ends - . In: Innes,M.A.; Gelfand,D.H.; Sninsky,J.J.; White,T.J. eds.: PCR-Protocols: a guide to Methods and Applications - Academic Press, New York

Frohman, M.A.; Dush, M.K.; Martin, G.R. (1988) – Rapid production of full-length cDNA´s from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002

Frommer W.B., Hummel S., Rentsch D. (1994) – Cloning of an *Arabidopsis* histidine transporting protein related to nitrate and peptide transporters – FEBS Lett. 347, 185-189

Fujiyoshi M., Nakatsubo T., Ogura S., Horikoshi T. (2000) – Estimation of mycelial biomass of arbuscular mycorrhizal fungi associated with the annual legume *Kummerowia striata* by ergosterol analysis – Ecol. Res. 15, 121-131

Gehrig H., Schüssler A., Kluge M. (1996) – *Geosyphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria) is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis – J. Mol. Evol. 43, 71-81

Gerdemann J.W. (1964) - The effect of mycorrhiza on the growth of maize - Mycologia 56, 342-349

Genre A., Bonfante P. (1998) – Actin versus tubulin configuration in arbuscule-containing cells from mycorrhizal tobacco roots – New Phytol. 140, 745-752

George, E.; Häussler, K.; Vetterlein, D.; Gorgus, E.; Marschner, H. (1992) – Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae* – Can. J. Bot. 70, 2130-2137

Gianinazzi-Pearson V. (1996) - Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis - The Plant Cell 8, 1871-1883

Gianinazzi-Pearson V., Dumas-Gaudot E., Gollotte A., Tahiri-Alaoui A., Gianinazzi S. (1996) – Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi – New Phytol. 133, 45-57

Giovanetti M., Sbrana C., Logi C. (1994) – Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi – New Phytol. 127, 703-709

Giovanetti M., Azzolini D., Citernesi A.S. (1999) – Anastomosis formation and nuclear protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi – Appl. Environ. Microbiol. 65, 5571-5575

Glass A.D.M. (1988) – Nitrogen uptake by plant roots – Atlas Sci. Anim. Plant. Sci. 1, 151-156

Glass A.D.M., Siddiqi M.Y. (1995) – Nitrogen absorption by plant roots. In: *Nitrogen Nutrition in Higher Plants* (Srivastava H.S., Singh R.P., eds.) New Dehli, India: Associated Publishing Co., pp. 21-56

Glenn M.G., Chew F.S., Williams P.H. (1988) – Influence of glucosinolate content of *Brassica* (Cruciferae) roots on growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi – New Phytol.110, 217-225

Grunewaldt-Stöcker G. (1989) - Microscopic characterization of VAM-fungal structures on expanded clay for inoculum production - Agric. Ecosystems Environm. 29, 179- 182

Gryndler M., Hrselova H., Chvatalova I. (1997) – An improved procedure for root surface disinfection suitable for observations of proliferation of intraradical hyphae of th arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fistulosum* – Folia Microbiologica 42(5), 489-494

Guerrero M.G, Vega J.M., Losada M. (1981) – The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation – Annu. Rev. Plant Physiol. 32, 169-204

Hafen E., Levine M., Garber R.L., Gehring W.J. (1983) - An improved *in situ* hybridization method for the detection of cellular RNAs in *Drosophila* tissue sections and its application for localizing transcripts of the homeotic *Antennapedia* gene complex - EMBO J. 2, 617-623

Harley J.L., Smith S.E. (1983) - Mycorrhizal Symbiosis - Academic Press, London

Harrison M.J. (1996) – A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations – The Plant J. 9, 491-503

Harrison M.J., van Buuren M. (1995) – A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* **–** Nature 378, 626-629

Hartig (1851) - Vollständige Naturgeschichte der forstlichen Kulturpflanzen Deutschlands – Berlin

Hawkins, H.-J. und George, E. (1999) – Effect of plant nitrogen status on the contribution of arbuscular mycorrhizal hyphae to plant nitrogen uptake - Physiol. Plant. 105, 694-700

Hayman D.S. (1974) - Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza - New Phytol. 73, 71-80

Hayman D.S. (1982) - Influence of soil and fertility and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi - Phytopath., 72, 1119-1124

Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996) - Real time quantitative PCR - Genome Res. 6, 986-994

Hepper,C.M. (1977) - A colorimetric method for estimating vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots - Soil Biol. Biochem. 9, 15-18

Hepper,C.M. (1983) – Limited independent growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro* – New Phytol. 93, 537-542

Higgins T.J.V., Goodwin P.B., Carr D.J. (1974) – The induction of nitrate reductase in mung bean seedlings – Aust. J. Plant Physiol 1, 1-8

Hildebrandt U., Kaldorf M., Bothe H. (1999) – The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi – J. Plant. Physiol. 154, 709-717

Ho I., Trappe J.M. (1975) - Nitrate reducing capacity of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi - Mycologia 67, 886-888

Hoagland D.R., Arnon D.I. (1939) – The water-culture method for growing plants without soil – California Agricultural Experiment Station Circular 347, 1-16 – Springer Verlag Berlin, Göttingen , Heidelberg

Hoff T., Stumman B.M., Henningsen K.W. (1992) – Structure, formation, and regulation of nitrate reductase in higher plants – Physiol. Plant. 84, 616-624

Höflich G., Wiche W., Kühn G. (1994) – Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms – Experientia 50, 897-905

Hole D.J., Emran A.M., Fares Y., Drew M.C. (1990) – Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13[1] – Plant Physiol. 93, 642-647

Horn K., Hahn A., Pausch F., Hock B. (1992) – Isolation of pure spore and hyphal fractions from vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi – J. Plant Physiol. 141, 28-32

Hosny M., Gianinazzi-Pearson V., Dulieu H. (1998) – Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales – Genome 41, 422-428

Huang N.-C., Chiang C.-S., Crawford N.M., Tsay Y.-F. (1996) – CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis* and shows cell type-specific expression in roots – Plant Cell 8, 2183-2191

Huang N.-C., Liu K.-H., Lo H.-J., Tsay Y.-F. (1999) – Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake – Plant Cell, 11 1381-1392

Jabaji-Hare S., Sridhara S.I., Kendrick B. (1984) – A technique for the isolation of intramatrical vesicles from vesicular-arbuscular mycorrhizae – Can. J. Bot. 62, 1466-1468

Jackson W.A., Flesher D., Hageman R.H. (1973) – Nitrate uptake by dark-grown corn seedlings. Some characteristics on apparent induction – Plant Physiol. 51, 120-127

Jakobsen I., Rosendahl L. (1990) – Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants – New Phytol. 115, 77-84

Jin S., Xu R., Wei Y., Goodwin P. (1999) – Increased expression of a plant actin gene during a biotrophic interaction between round-leaved mallow, *Malva pusilla*, and *Colletotrichum gloeosporoides* f. sp. *malvae* – Planta 209, 487-494

Johansen A., Jakobsen I., Jensen E.S. (1992) – Hyphal transport of ^{15}N-labelled nitrogen by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil N – New Phytol. 122, 281-288

Johansen A., Finlay R.D., Olsson P.A. (1996) – Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* – New Phytol. 133, 705-712

Jones J.B. (1982) – Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. J. Plant. Physiol 5, 1005-1030

Kaiser W.M., Huber S. (1994) - Modulation of nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*: Effects of phosphoprotein phosphatase inhibitors, free Mg^{2+} and 5´-AMP - Planta 194, 358-364

Kaiser W.M., Weiner H., Huber S.C. (1999) – Nitrate reductase in higher plants: a case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity – Physiol. Plant. 105, 385-390

Kaldorf M. (1996) – Die assimilatorische Nitratreduktase in der Symbiose zwischen dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus* und Mais – Inaugural-Dissertation, Universität zu Köln

Kaldorf M., Schmelzer E., Bothe H. (1998) – Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza – Mol. Plant-Microbe Interact.11, 439-448

Kaldorf M., Zimmer W., Bothe, H. (1994) – Genetic evidence for the occurrence of assimilatory nitrate reductase in arbuscular mycorrhizal and other fungi – Mycorrhiza 5, 23-28

Kaldorf M., Kuhn A.J., Schröder W.H., Hildebrandt U., Bothe H. (1999) – Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus – J. Plant Physiol. 154, 709-717

Kaldorf M., Ludwig-Müller J. (2000) – AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis – Physiol. Plant. 109, 58-67

Karandashov, V.; Kuzovkina, I.; Hawkins H.-J; George, E. (2000) –Growth and sporulation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium* in dual culture with transformed carrot roots – Mycorrhiza 10, 23-28

King B.J., Siddiqi M.Y., Ruth T.J., Warner A.L., Glass A.D.M. (1993) – Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium – Plant Physiol. 102, 1279-1286

Kiss T., Kis M., Abel S., Solymosy F. (1989) – Nucleotide sequence of a 17s (18s) rRNA gene from tomato – Nucleic Acids Res. 17, 2127-2127

Klingner A., Bothe H., Wray V., Marner F.-J. (1995) - Identification of a yellow pigment formed in maize roots upon mycorrhizal colonization - Phytochemistry 38, 53-55

Koide R.T., Li M. (1990) - On host regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis - New Phytol. 114, 59-74

Kothari S.K., Marschner H., George E. (1990) - Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize - New Phytol. 116, 303-311

Kothari S.K., Marschner H., Römheld V. (1991) - Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown in a calcareous soil - Plant and Soil 131, 177-185

Krajinski F., Biela A., Schubert D., Gianinazzi-Pearson V., Kaldenhoff R., Franken P. (2000) – Arbuscular mycorhiza development regulates the m-RNA abundance of *Mtaqp*1 encoding a mercury-isensitive aquaporin of *Medicago truncatula* – Planta 211, 85-90

Krapp A., Fraisier V., Scheible W.-R., Quesada A., Gojon A., Stitt M., Caboche M., Daniel-Vedele F. (1998) – Expression studies of *Nrt2:1Np*, a putative high-affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake – The Plant Journal 14, 723-731

Kronenberger J., Lepingle A., Caboche M. (1993) – Cloning and expression of distinct nitrite reductases in tobacco leaves and roots – Mol. Gen. Genet. 236, 203-208

Kronzucker H.J., Glass A.D.M., Siddiqi M.Y. (1999) – Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. Analysis of component fluxes – Plant Physiol. 120, 283-291

Kutscherra K., Jost W., Schlee D. (1987) – Isoenzymes of nitrite reductase in higher plants – occurrence, purification, properties and alterations during ontogenesis – J. Plant Physiol. 129, 383-393

Lahners K., Kramer V., Back E., Privalle L., Rothstein S. (1988) – Molecular cloning of complementary DNA encoding maize nitrite reductase: molecular analysis and nitrate induction – Plant Physiol. 88, 741-746

Laine P., Ourry A., Boucaud J. (1995) – Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: Effects of localized nitrate supply – Planta 196, 77-83

Lanfranco L., Perotto S., Longato S., Mello A., Cometti V., Bonfante P. (1998) – Molecular approaches to investigate biodiversity in mycorrhizal fungi – In: Varma H. (Ed.) – Mycorrhiza Manual, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 353-372

Lauter F.-R., Ninnemann O., Bucher M., Riesmeier J.W., Frommer W.B. (1996) – Preferential expression of an ammonium transporter and two nitrate transporters in root hairs of tomato – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8139-8144

Le Bot J., Kirkby A.E. (1992) - Diurnal uptake of nitrate and potassium during the vegetative growth of tomato plants – J. Plant Nutr. 15, 247-264

Lee R.B., Drew M.C. (1986a) – Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in barley roots. II. Effect of plant N-statuson the kinetic parameters of nitrate influx - J. Exp. Bot. 37, 1768-1779

Lee R.B., Rudge K.A. (1986b) – Effects of nitrogen deficiency on the absorption of nitrate and ammonium in barley plants – Ann. Bot. 57, 471-486

Lejay L., Tillard P., Lepetit M., Olive F.D., Filleur S., Daniel-Vedele F., Gojon A. (1999) – Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants – The Plant Journal 18, 509-519

Lin C.-M., Koh S., Stacey G., Yu S.-M., Lin T.-Y, Tsay Y.-F. (2000) – Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, *OsNRT1*, from rice – Plant Physiol. 122, 379-388

Liu H., Trieu A.T., Blaylock L.A. Harrison M.J. (1998a) – Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: Regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi – Mol. Plant-Microbe Interact. 11, 14-22

Liu C., Muchal U., Uthappa M., Kononowicz A.K., Raghothama K.G. (1998b) – Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus – Plant Physiol. 116, 91-99

Liu K.-H., Huang C.-Y., Tsay Y.-F. (1999) – CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake – Plant Cell 11, 865-874

Lloyd-MacGilp S.A., Chambers S.M., Dodd J.C., Fitter A.H., Walker C., Young J.P.W. (1996) - Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi - New Phytol. 133, 103-111

Lohaus G., Büker M., Hussmann M., Soave C., Heldt H.-W. (1998) - Transport of aminoacids with special emphasis on the synthesis and transport of asparagine in Illinois Low Protein and Illinois High Protein strains of maize - Planta 205, 181-188

MacKown C.T., Volk R.J., Jackson W.A. (1982) – Nitrate assimilation by decapitated corn root systems: Effects of ammonium during induction – Plant Sci. Lett. 24, 295-302

Mader P., Vierheilig H., Streitwolf-Engel R., Boller T., Frey B., Christie P., Wiemken A. (2000) – Transport of ^{15}N from a soil compartment separated by a polytetrafluoroethylene membrane to plant roots via the hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi – New Phytol. 146, 155-161

Maier W., Peipp H., Schmidt J., Wray V., Strack D. (1995) – Levels of a terpenoid glycoside (blumenin) and cell wall-bound phenolics in some cereal mycorrhizas – Plant Physiol. 109, 465-470

Marschner H.L. (1995) – Mineral nutrition of higher plants – Academic Press, London

Marzluf G.A. (1997) – Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi – Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 17-32

Mathur N., Vyas A. (1995) - Changes in nitrate reductase and glutamine synthetase activities in *Ziziphus mauritiana* by different VAM fungi - Curr. Sci. 68, 1144-1146

McArthur D.A.J., Knowles N.R. (1993) - Influence of species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus nutrition on growth, development, and mineral nutrition of potato (Solanum tberosum L.) - Plant Physiol. 102, 771-782

McClure P.R., Kochian L.V., Spanswick A.M., Shaff J.E. (1990) – Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on membrane potential – Plant Physiol. 93, 281-289

McPherson M.J., Jones K.M., Gurr S.J. (1991) – PCR with highly degenerate primers – In: McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R. eds.: PCR – a practical approach – Oxford University Press, Oxford, 171-185

Menge,J.A.; Steirle,D.; Bagyaraj,D.J.; Johnson,E.L.V.; Leonard, R.T. (1978) - Phosphorus concentration in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection - New Phytol., 80, 575-578

Migge A., Carrayol E., Hirel B., Lohmann M., Meya G., Becker T.W. (1998) – Two nitrite reductase isoforms are present in tomato cotyledons and are regulated differently by UV-A or UV-B light and during plant development – Planta 207, 229-234

Miller A.J., Zhou J.J. (2000) – *Xenopus* oocytes as an expression system for plant transporters – Biochim. Biophys. Acta 1465, 343-358

Morton J.B. (1990) - Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae - Mycologia 82, 192-207

Mosse B. (1987) – Some studies relating to “independent” growth of vesicular-arbuscular endophytes – Can. J. Bot. 66, 2533-2540

Mugnier J., Mosse B. (1987) – Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically – Phytopathology 77, 1045-1050

Muldin I., Ingemarsson B. (1995) – A cDNA from *Brassica napus* L. encoding a putative nitrate transporter (GenBank U17987) – Plant Physiol. 108, 1341-1343

Muller B., Tourraine B. (1992) – Inhibition of nitrate uptake by various phloem translocated amino acids in soybean seedlings – J. Exp. Bot. 43, 617-623

Nagy F., Kay S., Chua N.-H. (1988) - Analysis of gene expression in transgenic plants, pp. B4:1-29 in *Plant Molecular Biology Manual* (S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort, Hrsg.) Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands

Nelsen C.E., Safir G.R. (1982) - Increased drought tolerance of mycorrhizal onion plants caused by improved phosphorus nutrition - Planta 154, 407-413

Neuer G.; Kronenberg A.; Bothe H. (1985) - Denitrification and nitrogen fixation by *Azospirillum*. III. Properties of a wheat-*Azospirillum* association - Arch. Microbiol. 141, 364-370

Newman E.I., Eason W.R., Eissenstat D.M., Ramos M.I.R.F. (1992) – Interactions between plants: the role of mycorrhizae – Mycorrhiza 1, 47-53

Noji S., Nohno T., Saito T., Taniguchi S. (1989) – The *narK* gene product participates in nitrate transport induced in *Escherichia coli* nitrate-respiring cells – FEBS Lett. 252, 139-143

Oaks A. (1994) – Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation – Can.J. Bot. 72, 739-750

Oaks A., Aslam M., Boesel I. (1977) – Ammonium and amino acids as regulators of nitrate reductase in corn roots – Plant Physiol. 59, 391-394

Oaks A., Stulen I., Boesel I. (1979) – Influence of amino acids and ammonium on nitrate reduction in corn seedlings – Can. J. Bot. 57, 1824-1829

Oliver A.J., Smith S.E., Nicholas D.J.D., Wallace W., Smith F.A. (1983) - Activity of nitrate reductase in *Trifolium subterraneum*: Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition - New Phytol. 94, 63-79

Ono F., Frommer W.B., von Wirén N. (2000) – Coordinated diurnal regulation of low- and high-affinity nitrate transporters in tomato – Plant Biol. 2, 17-23

Padgett P.E., Leonard R.T. (1993) – Contamination of ammonium-based nutrient solutions by nitrifying organisms and the conversion of ammonium to nitrate - Plant Physiol. 101, 141-146

Palms B., Goupil P., de Almeida Engler J., Van Der Straeten D., Van Montagu M., Rambour S. (1996) – Evidence for the nitrate-dependent spatial regulation of the nitrate reductase gene in chicory roots – Planta 200, 20-27

Pawlowska T.E., Douds D.D., Charvat I. (1999) – *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum* – Mycol. Res. 103, 1549-1556

Peat H.J., Fitter A.H. (1993) - The distribution of arbuscular mycorrhizas in the British flora - New Phytol. 125, 845-854

Peterson C.A. (1988) – Exodermal Casparyan bands: their significance for ion uptake by roots – Physiol. Plant. 72, 204-208

Pfeffer P.E., Douds D.D.Jr., Bécard G., Shachar-Hill Y. (1999) – Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza – Plant Physiol. 120, 587-598

Phillips J.M., Hayman D.S. (1970) - Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection - Trans. Br. Mycol. Soc., 158-168

Pirozynski K.S. (1981) - Interactions between fungi and plants through the ages - Can. J. Bot., 59, 1824-1827

Pond E.C., Menge J.A., Jarrell W.M. (1984) - Improved growth of tomato in salinized soil by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi collected from saline soils - Mycologia 76, 74-84

Pringle A., Moncalvo J.-M., Vilgalys R. (2000) – High levels of variation in ribosomal DNA sequences within and among spores of a natural population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora colossica* – Mycologia 92, 259-268

Quesada A., Galvan R., Fernandez E. (1994) – Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii* – Plant J. 5, 407-419

Quesada A., Krapp A., Trueman L.J., Daniel-Vedele F., Fernandez E., Forde B.J., Caboche M. (1997) – PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the *crnA* family – Plant Mol. Biol. 34, 265-274

Quetz P.-C., Tischner R., Lorenzen H. (1982) – Changes in the activity of enzymes involved in nitrogen metabolism in maize seedlings dependent on different nitrogen sources – Biochem. Physiol. Pflanzen 177, 567-576

Raeder U., Broda P. (1985) - Rapid preparation of DNA from filamentous fungi - Lett. Appl. Microbiol. 1, 17-20

Ratnayake,M.; Leonard,R.T.; Menge,J.A. (1978) - Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation - New Phytol., 81, 543-552

Read D. (1997) - The ties that bind - Nature 388, 517-518

Redecker D., Morton J.B., Bruns T.D. (2000) – Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinosum* and *Sclerocystis coremioides* – Mycologia 92, 282-285

Reinold S. (1995) - Vergleichende Untersuchungen zur Lokalisation des Phenylpropan-stoffwechsels in ausgewählten Pflanzen - Inaugural-Dissertation, Universität zu Köln

Rentsch D., Laloi M., Rouhara I., Schmelzer E., Delrot S., Frommer W.B. (1995) – NTR1 encodes a high-affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis* – FEBS Lett. 370, 264-268

Requena N., Füller P., Franken P. (1999) – Molecular characterization of *GmFOX2*, an evolutionarily highly conserved gene from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*, down-regulated during interaction with rhizobacteria – Mol. Plant Microbe Interact. 12, 934-942

Rosewarne G.M., Barker S.J., Smith S.E., Smith F.A., Schachtman D.P. (1999) – A *Lycopersicon esculentum* phosphate transporter (LePT1) involved in phosphorus uptake from a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus – New Phytol. 144, 507-516

Ruiz-Lozano J.M., Azcón R. (1996) – Mycorrhizal colonization and drought stress as factors affecting nitrate reductase activity in lettuce plants – Agric. Ecosyst. 60, 175-181

Saif,S.R. (1981) - The influence of soil aeration on the efficiency of vesicular-arbuscular mycorrizae. I. Effect of soil oxygen on growth and mineral uptake in *Eupatorium odoratum* L. inoculated with *Glomus macrocarpus* - New Phytol., 88, 649-659

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) - Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase - Science 239, 487-491

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985) - Enzymatic amplification of β-Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia - Science 230, 1350-1354

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) - Molecular cloning: A laboratory manual (2^{nd} edition) - Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) - DNA sequencing with chain-terminating inhibitors - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467

Scheible W.-R., González-Fontes A., Morcuende R., Lauerer M., Geiger M., Glaab J., Gojon A., Schulze E.-D., Stitt M. (1997) – Tobacco mutants with a decreased number of *functional nia* genes compensate by modifying diurnal regulation of

transcription, post translational modification and turnover of nitrate-reductase – Planta 203, 304-319

Schmelzer E., Jahnen W., Hahlbrock K. (1988) - *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2989-2993

Schmelzer E., Krüger-Lebus S., Hahlbrock K. (1989) - Temporal and spatial patterns of gene expression around sites of attempted fungal infection in parsley leaves - Plant Cell 1, 993-1001

Schmitz O., Danneberg G., Hundeshagen B., Klingner A., Bothe H. (1991) - Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhiza by biochemical parameters - J. Plant Physiol. 139, 106-114

Siddiqi M.Y., King B.J., Glass A.D.M. (1992) – Effects of nitrite, chlorate, and chlorite on nitrate uptake and nitrate reductase activity – Plant Physiol. 100, 644-650

Siebrecht S., Maeck G., Tischner R. (1995) – Function and contribution of the root tip in the induction of NO_3^- uptake along the barley root axis – J. Exp. Bot. 292, 1669-1676

Sieverding E. (1980) - Einfluß der Bodenfeuchte auf die Entwicklung und Effektivität der vesikulär-arbuskulären Mykorrhiza - Dissertation, Göttingen

Simon L. (1996) – Phylogeny of the Glomales: deciphering the past to understand the present – New Phytol. 133, 95-101

Simon L., Bousquet J., Lévesque R.C., Lalonde M. (1993) - Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants - Nature 363, 67-69

Simoneau P., Louisy-Lois N., Plenchette C., Strullu D.G. (1994) – Accumulation of new polypeptides in Ri T-DNA-transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae - Appl. Microbiol. 60, 1810-1813

Smith M., Bellissimo D., Davis R.W. (1988) – Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thaliana* mRNA encoding nitrate reductase, a metalloflavoprotein with three functional domains – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5006-5010

Smith S.E., Gianinazzi-Pearson V. (1988) - Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants - Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.39, 221-244

Smith S.E., Smith F.A. (1990) – Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport – New Phytol. 114, 1-38

Smith F.W., Hawkesford M.J., Ealing P., Clarkson D.T., Vanden Berg P.J., Belcher A.R., Warrilow A.G.S. (1997) – Regulation and expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter – The Plant J. 12, 875-884

Snell F.D., Snell C.T. (1949) - Colorimetric methods of analysis - 3. Aufl., Van Nostrand, New York, 802-807

Somssich I.E., Schmelzer E., Kawalleck P., Hahlbrock K. (1988) - Gene structure and *in situ* transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley - Mol. Gen. Genet. 213, 93-98

Song W., Steiner H.K., Zhang L., Naider F., Stacey G., Becker J.M. (1996) – Cloning of a second *Arabidopsis* peptide transport gene – Plant Physiol. 110, 171-178

Soualmi K., Champigny M.L. (1986) – Comparison of the NADH:nitrate reductases from wheat shoots and roots – J. Plant Physiol. 125, 35-45

Southern E.M. (1975) - Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis - J. Mol. Biol. 98, 503-517

Stitt M. (1999) – Nitrate regulation of metabolism and growth – Curr. Opin. Plant Biol. 2, 178-186

Subramanian K.S., Charest C. (1998) – Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery – Physiol. Plant. 102, 285-296

Subramanian K.S., Charest C. (1999) – Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize under drought-stressed ans well-watered conditions – Mycorrhiza 9, 69-75

Sylvia D.M. (1990) – Distribution , structure, and function of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi – In: Box J.E., Hammond L.H. (ed.) – Rhizosphere dynamics – Westview Press, Boulder, CO., p. 144-167

Tagu D., Nasse B., Martin F. (1996) – Cloning and characterization of hydrophobins encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* – Gene 168, 93-97

Taylor A.R., Bloom A.J. (1998) – Ammonium, nitrate, and proton fluxes along the maize root – Plant, Cell and Environment 21, 1255-1263

Thapar S., Sekhon B.S., Atwal A., Singh R. (1990) - Nitrogen and ammonium assimilation in mycorrhizal and nonmycorrhizal *Vigna radiata* plants - Plant Physiol. Biochem. 28, 727-733

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) – CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, gap penalties and weight matrix choice – Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680

Tilburn J., Scazzocchio L., Taylor G.G., Zabicky-Zissman J.H., Lockington R.A., Davies R.W. (1983) - Transformation by integration in *Aspergillus nidulans* - Gene 26, 205-221

Timmusk S., Wagner E.G. (1999) – The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymixa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses – Mol. Plant Microbe Interact. 12, 951-959

Tobar R., Azcón R., Barea J.M. (1994) - Improved nitrogen uptake and transport from ^{15}N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions - New Phytol. 126, 119-122

Tobar R.M., Azcón R., Barea J.M. (1994b) – The improvement of plant N acquisition from an ammonium treated, drought stressed soil by the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizae – Mycorrhiza 4, 105-108

Toth R., Doane C., Bennett E., Alexander T. (1990) – Correlation between host-fungal surface areas and percent colonization in VA mycorrhizae – Mycologia 82, 519-522

Toth R., Miller R.M. (1984) – Dynamics of arbuscule development and degeneration in *Zea mays* mycorrhiza – Am. J. Bot. 71, 449-460

Tourraine B., Glass A.D.M. (1997) – NO_3^- and ClO_3^- fluxes in the chl1-5 mutant of *Arabidopsis thaliana* – Plant Physiol. 114, 137-144

Tsai S.M., Phillips D.A. (1991) – Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro – Appl. Microbiol. 57, 1485-1488

Tsay Y.-F., Schroeder J.I., Feldmann K.A., Crawford N.M. (1993) – The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter - Cell 72, 705-713

Unkles S.E., Hawker K.L., Grieve C., Campbell E.I., Montague P., Kinghorn J.R. (1991) – *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans* – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 204-208

Vidmar J.J., Zhuo D., Siddiqi M.Y., Glass A.D.M. (2000a) – Isolation and characterization of *HvNRT*2.3 and *HvNRT*2.4, cDNAs encoding high-affinity nitrate transporters from roots of barley – Plant Physiol. 122, 783-792

Vidmar J.J., Zhuo D., Siddiqi M.Y., Schjoerring J.K., Tourraine B., Glass A.D.M. (2000b) – Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley – Plant Physiol. 123, 307-318

Viera A., Glenn M.G. (1990) - DNA content of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores - Mycologia 82, 263-267

Vierheilig H., Coughlan A.P., Wyss U., Piche Y. (1998) – Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi – Appl. Environ. Microbiol. 64(12), 5004-5007

Villegas J., Williams R.D., Nantais L., Archambault J., Fortin J.A. (1996) – Effects of N-source on pH and nutrient exchange of extramatrical mycelium in a mycorrhizal Ri T-DNA transformed root system – Mycorrhiza 6, 247-251

Vincentz M., Moreaux T., Leydecker M.T., Vaucheret H., Caboche M. (1993) – Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen ans carbon metabolites – Plant J. 3, 315-324

von Wirén N., Gazzarrini S., Gojon A., Frommer W.B. (2000) – The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval – Curr. Opin. Plant. Biol. 3, 254-261

Walker C., Trappe C.M. (1993) - Names and epithets in the Glomales and Endogonales - Mycological Research 97, 339-344

Walley F.L., Germida J.J. (1996) – Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria – Mycorrhiza 6, 43-49

Wang R., Crawford N.M. (1996) – Genetic identification of a gene involved in constitutive, high-affinity nitrate transport in higher plants - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9297-9301

Wang T.-B., Gassmann W., Rubio F., Schroeder J.I., Glass A.D.M. (1998) – Rapid Up-Regulation of *HKT1*, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium – Plant Physiol. 118, 651-659

Webster, J. (1983) - Pilze - Eine Einführung - Gustav Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Werner D. (1987) - Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen - Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York

West C.E., Waterworth W.M., Stephens S.M., Bray C.M. (1998) – Cloning and functional characterisation of a peptide transporter expressed in the scutellum of barley grain during the early stages of germination – Plant J. 15, 221-229

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990) - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innes,M.A.; Gelfand,D.H.; Sninsky,J.J.; White,T.J. eds.: PCR-Protocols: a guide to Methods and Applications - Academic Press, New York, 315-322

Wolt J.D. (1994) – Soil solution chemistry – John Wiley & Sons

Wray J.L, Ward M.P. (1994) – Biochemistry, genetics and molecular biology of higher plant nitrite reduction – Nova Acta Leopoldina NF 70, Nr. 288, 59-72

Zézé A., Sulistyowati E., Ophel-Keller K., Barker S., Smith S. (1997) – Intersporal genetic variation of *Gigaspora margarita*, a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, revealed by M13 minisatellite-primed PCR – Appl. Environ. Microbiol. 63, 676-678

Zhou J., Kleinhofs A. (1996) – Molecular evolution of nitrate reductase genes – J. Mol. Evol. 42, 432-442

Zhuo D., Okamoto M., Vidmar J., Glass A.D.M. (1999) – Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2;1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana* – The Plant Journal 17, 563-568

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ALS	Arbuskel-ähnliche Struktur
AM	arbuskuläre Mykorrhiza
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BAS	branched absorbing structure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphospha)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
cDNA	complementäre DNA
Ci	Curie = $3,7x10^{10}$ Bequerel = $2,2x10^{12}$ cpm
CI	Chloroform/Isoamylalkohol (24 :1)
cpm	Zählimpulse pro Minute
CSPD	Dinatrium 3-(4methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2`-(5`-chloro)tricyclo [3.3.1.$1^{3,7}$]decan}-4-yl) phenylphosphat
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
G	Guanosin
GOGAT	Glutamatsynthase
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunde
HEPES	*N*-2-Hydroxyethylpiperazin-*N*´-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid

Kap.	Kapitel
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani (Kulturmedium nach Luria und Bertani, modifiziert)
M	Molar
MES	*N*-Morpholinoethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
mRNA	Messenger-(Boten)-RNA
MW	modifiziertes Kulturmedum nach White
NAD^+	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
$NADP^+$	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduziert
n.b.	nicht bestimmt
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
n.d.	nicht durchgeführt
NiR	Nitritreduktase
NR	Nitratreduktase
NRA	Nitratreduktase-Aktivität
OD	Optische Dichte
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RACE	Schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Nukleosidtriphosphate
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
SSC	Natriumcitrat-Puffer
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Elektrophoresepuffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
t-BuOH	tertiäres Butanol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
v.l.n.r.	von links nach rechts
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-galactopyranosid
z.T.	zum Teil

7.2 DNA-Sequenzen

A3-1:

```
AGTGTTATGTTCACT GGAAAGATTATCGGA CTCGTTAACGGATGT
GCTGGAGGGTGGGGA GATATGGGAGGAGGA GTGACTCAGCTACTA
ATGCCAATGGTCTTC CACGTCATCAAACTC ACCGGAGCCACTCCC
TTCACGGCTTGGAGG........

TTTGGTGTTGCTCCT TTCGTTTCCCGCCGT TCTCTTGGACTTATC
TCGGGATTAACTGGT GCTGGTGGAAATTTT GGGTCGGGAGTTACT
CAACTTCTTTTCTTC TCTTCCTCGAGGTTT AGTACGGCGGAAGGA
CTATCGTTGATGGGC GTTATGGCTGTTGGT GCTCTCTTCCGGTTG
CGTTTATA
```

A3-29:

```
AGCACTATGTTCAAC AGTCAGATCATCGGT CTGGTGAACGGGACA
GCAGCCGGATGGGGA AACATGGGTGGCGGC ATAACGCAGTTGCTC
ATGCCCATTGTGTAT GAAATCATTAGGCGC TGCGGATCAACAGCG
TTCACGGCCTGGAGG ATCGCCTTCTTTGTC CCCGGTTGGTTGCAC
ATCATCATGGGAATC TTGGTGCTCACGCTA GGTCAAGATCTGCCA
GGTGGAAACAGAGCT ..........

CCCTTTGTCTCCCGG CGAGCTCTAGGCATT ATCTCGGGTTTAACC
GGGGCTGGAGGGAAC TTTGGGTCAGGACTC ACACAGCTCGTCTTT
TTCTCGACTTCGCGC TTCACAACTGAAGAA GGGCTAACGTGGATG
GGAGTGATGATAGTT GCTTGCACGTTGCCT GTTACCTTAATC
```

T1-6:

```
AGTACTATGTTTAAT AGTAAGATCATAGGG CTAGTGAACGGAACG
GCTGCTGGATGGGGT AATATGGGTGGAGGT GCAACTCAACTCATT
ATGCCACTTTTGTAT GATATAATTCGGAGG GCGGGTGCAACTCCG
TTCACTGCTTGGAGA ATTGCATTTTTTATT CCTGGATGGCTTCAT
GTGGTGATGGGTATT TTAGTGTTGACTCTT GGCCAAGATTTACCC
GACGGAAATCGTGGC ACTTTACAGAAGACG GGTACTGTT.....

GGAGGAGTATTTTGT GTTCTTTTGGGTCGT TCGAATTCTCTACCA
CTTGCTGTAACCTTT ATGATCCTTTTCTCA ATCGGAGCTCAAGCT
GCTTGTGGTGCAACT TTTGGTATTATTCCA TTCATTTCTCGACGA
TCGTTAGGAATTATA AGCGGAATGACAGGG GCAGGTGGAAATTTT
GGTTCTGGATTGACT CAATTGTTGTTTTTC ACGAGCTCAAAGTAC
TCGACAGCGACAGGG TTAACTTACATGGGA TTCATGATCATAGGA
TGCACTCTTCCTGTT ACATTTTGT
```

T1-7:
AGTACGATGTTTAAT AGTCAAATCATTGGA CTTGTGAATGGTACA
GCTGCTGGATGGGGT AATATGGGTGGTGGT GCTACTCAACTTATT
ATGCCTTTGCTCTAC GATATAATACGTAGA GCAGGGGCAACCCCG
TTCACTGCTTGGAGA ATCGCATTTTTTATT CCTGGATGGCTTCAT
GTTATTATGGGAATT TTAGTTTTAACTCTT GGACAAGATTTACCT
GATGGTAACCTCGCT TCTTTACAGAAGAAA GGCGATGTT......

CANTGTGGTGCAACG TTTGGAATTATTCCC TTTATTTCGCGAAGA
TCATTAGGTATAATA TCAGGTATGACAGGA GCTGGAGGCAATTTT
GGTTCCGGATTGACA CAACTACTGTTTTTC ACGAGCACAAAGTAC
TCGACAGGAACAGGA CTAACGTATATGGGG ATGATGATCATCGCG
TGTACACTTCCAGTA ATGTTAGTT

NR1:
GTATTCAAACGATCG AACGGGTTCAGTTGG GGTCCGCTGCCGTCG
GATTGCGCAACCTGG ACTGGAGTTCCACTC TGCGAGTTGCTCTCC
AGGTGTGGAGTGAAC ATGAATGACTCGGAC GCCCCAATGCAATAC
GTCAATTTCGATGGC TGTGACGACCTACCA AAG

NR2:
AATGTTGTCCGAAAA TCGAAAGGTTTTTCG TGGGGAGCGGCTGGT
CTCTCGACTGCGCTC GGACCGGCGTACCGA TTGGTGCTCTGCTAA
GAATGGCAAAACCAA GCAGAGCTGCCAAAT ATGTGTGTTTTGAGG
GAGCAGACAAGCTGC CTAACGG

T2-2:
AGGAAATGCAAGTTC AGCCAACAACGTTAC AAATTTTCTTGGGAC
TTCATTTATGTTAAC TTTACTTGGTGGATT TGTAGCCGACACTTT
TCTTGGACGG***TTCGT AAATTTCTATGATTT AAAATTTATATAATA***
ATTATGTCATGACTA GCTAACATATTTTTT ATTTTTTTTAAAATT
AATCAGGTACCTTAC AATTGGTATCTTTAC TACTATTCAAGCTAT
GG***TACGTGTTAATTA TTTTCTTGAATATTG ATTGGTTGATTACTT***
AAATAGATAAATAGA AAATTTTTTATTTTT ATGAAGTGACTTAGC
TTTATATACTTTTTA AGTGCCATCATGTTG GAATCGGACTTAACT
TGGTCATCATCATTA TCATCATCAAATCAA GTTTTTTATTTTCTT
CTTACGTGAGATTGA TGCATGGCAAATTTA TAAAAACTTTTTCTA
.....
GTGTTACGATCTTGA CCATTTCAACTATAA TCCCAQAGCCTCCAA
CCACCAAAGTGCGAG CTAGGTAGTTCAACA TGCATCCCCGCCCGA
GTGGCAAACAACTCA TGGTCCTATACATCG CGCTATACATGACCG
CACTCGGGACCGGGG GGTTAAAATCCAGCG TGTCCGGGTTCGGGT
CGGACCAATTTGATG AAACGGACAAAAAAG AAAGAGGACAAATGA
TAAAATTCTTCAATT GGTTCTTTTTCTTTA TTAACGTGGGATCAC
TAGGTGCAGTGACAA TATTAGTGTACATTC AAGATAATTTGGGAA
GA

Mutmaßliche Intronbereiche sind durch Kursiv- und Fettdruck hervorgehoben

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Universität zu Köln unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Bothe angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Bothe danke ich für die Überlassung des Themas, für die während der Bearbeitung gewährte Unterstützung und insbesondere für die vielen anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Hj.A.W. Schneider-Poetsch danke ich für die Übernahme des Corerferats.

Für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung der Versuche bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Danken möchte ich auch den Dozenten und Kollegiaten des Graduiertenkollegs „Molekulare Analyse von Entwicklungsprozessen bei Pflanzen“ für die intensiven und hilfreichen Diskussionen.

Frau Kerstin Nawrath danke ich für die technische Assistenz, insbesondere für die Unterstützung bei der Bonitierung der Wurzelproben.

Die *In situ*-Hybridisierungsexperimente wurden am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln-Vogelsang in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. K. Hahlbrock durchgeführt. Danken möchte ich Prof. Dr. K. Hahlbrock und Dr. E. Schmelzer, in dessen Labor ich die Versuche durchführen durfte. Mein Dank gilt insbesondere Herrn Dr. E. Schmelzer für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge sowie Frau I. Rouhara für die technische Assistenz bei der Durchführung der Versuche.

Darüber hinaus möchte ich mich vor allem bei Herrn Dr. M. Kaldorf, Herrn Dr. O. Schmitz, Herrn Dr. A. Mergel, Frau Dr. G. Boison, Herrn Dr. H.Ü. Kolukisaoglu, Herrn Dr. A. Weber sowie bei Herrn F. Ouziad, Frau K. Janetta, Frau Melanie Landwehr und allen übrigen Mitarbeitern des Botanischen Instituts und des Max-Planck-Institutes bedanken, die durch Ratschläge und Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Köln 20.07.2000

Ich versichere, daß die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.
Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. H. Bothe betreut worden.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Tagungen vorgestellt:

VAAM/DGHM Tagung, Göttingen, März 1999

COST-Action Workgroup-Meeting 838, CSIC Santiago de Compostela, Spanien, Mai 2000

Köln den 20.07.2000

Lebenslauf

Name	Ulrich Hildebrandt
geboren am	06.03.1971
Geburtsort	Grevenbroich
Eltern	Reinhard Hildebrandt Linda Hildebrandt, geb. Bojanowski
Familienstand	ledig
22.08.1977-21.07.1981	Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Pütz
07.09.1981-01.06.1990	Besuch des Städtischen Gymnasiums Bedburg, Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
02.07.1990-30.06.1991	Wehrdienst als Grundwehrdienstleistender
01.10.1991-17.01.1997	Biologiestudium an der Universität zu Köln, Abschluß: Diplom
01.02.1997-31.01.2000	Stipendiat im Graduiertenkolleg „Molekulare Analyse von Entwicklungsprozessen bei Pflanzen"
seit SS 1997	Promotionsstudium Biologie
seit 01.02.00	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Botanischen Institut der Universität zu Köln

Köln, den 20.07.2000

Bisherige Publikationen:

Schreiner T., Hildebrandt U., Bothe H., Marner F.-J. (1998) – Chemical and biological characterization of corticrocin, a yellow pigment formed by the ectomycorrhizal fungus *Piloderma croceum* – Z. Naturforsch. 53c, 4-8

Hildebrandt U., Kaldorf M., Bothe H. (1999) – The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi – J. Plant. Physiol. 154, 709-717

Kaldorf M., Kuhn A.J., Schröder W.H., Hildebrandt U., Bothe H. (1999) – Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus - J. Plant. Physiol. 154, 718-728

Hildebrandt U., Janetta K., Ouziad F., Renne B., Nawrath K., Bothe H. (2000) – Arbuscular mycorrhizal colonization of halophytes in Central European salt marshes - eingereicht